

## CASEIN HYDROLYZATE AND ITS PRODUCTION

Publication number: JP11243866 (A)

Publication date: 1999-09-14

Inventor(s): HAYASAWA HIROKI; MIYAGAWA HIROSHI; OCHI HIROSHI

Applicant(s): MORINAGA MILK INDUSTRY CO LTD

Classification:

- international: A23L1/305; A23J3/10; A23J3/34; C12P21/06; A23L1/305; A23J3/00; C12P21/06;  
(IPC1-7): A23J3/34; A23J3/10; A23L1/305; C12P21/06

- European:

Application number: JP19980071371 19980305

Priority number(s): JP19980071371 19980305

Abstract of JP 11243866 (A)

PROBLEM TO BE SOLVED: To produce a nearly tasteless and odorless low-molecular weight casein hydrolyzate, excellent in digestibility and absorbability, having a low content of free amino acids and 100 amino acid score, transparent in a solution state and having characteristics excellent in the so-called preservation stability without causing the turbidity, precipitation, browning, etc., even by preservation for a long period in the solution state and to provide a method for producing the casein hydrolyzate. SOLUTION: A casein is brought into contact with an adsorbent resin to adsorb and remove taste and odor. The resultant resin-treated casein is then hydrolyzed with a proteolytic enzyme and insoluble substances are then separated by filtration. The prepared filtrate is further brought into contact with an adsorbent resin to adsorb and remove a bitter peptide and a turbid factor, etc.; Thereby, a tasteless and odorless hydrolyzate is obtained. The resultant hydrolyzate preferably has  $\geq 75$  wt.% ratio of a fraction having  $\leq 1,000$  Da molecular weight in  $\leq 1$  wt.% ratio of a fraction having  $\geq 3,500$  Da molecular weight.

Data supplied from the *esp@cenet* database — Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-243866

(43)公開日 平成11年(1999) 9月14日

(51)Int.Cl.<sup>8</sup>

識別記号

F I

A 2 3 J 3/34

A 2 3 J 3/34

3/10

3/10

A 2 3 L 1/305

A 2 3 L 1/305

C 1 2 P 21/06

C 1 2 P 21/06

審査請求 未請求 請求項の数3 F D (全 13 頁)

(21)出願番号 特願平10-71371

(22)出願日 平成10年(1998) 3月5日

(71)出願人 000006127

森永乳業株式会社

東京都港区芝5丁目33番1号

(72)発明者 早澤 宏紀

神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永

乳業株式会社栄養科学研究所内

(72)発明者 宮川 博

神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永

乳業株式会社栄養科学研究所内

(72)発明者 越智 浩

神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永

乳業株式会社栄養科学研究所内

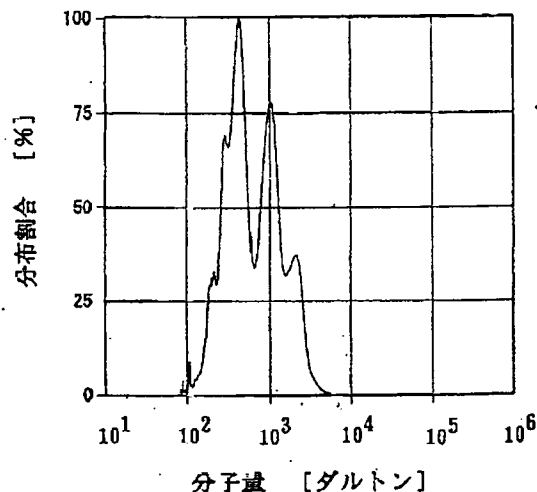
(74)代理人 工藤 力

(54)【発明の名称】 カゼイン加水分解物及びその製造法

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 低分子量で、消化吸収性に優れ、低アミノ酸遊離率で、アミノ酸スコア100を有し、ほぼ無味無臭であり、溶液状態で透明で、かつ溶液状態での長期保存においても混濁、沈殿、凝集、褐変等を生じない、いわゆる保存安定性に優れた特性を具備したカゼイン分解物及びその製造法を提供する。

【解決手段】 カゼインに吸着性樹脂を接触させて、味及び臭を吸着除去し、得られた樹脂処理カゼインを蛋白分解酵素で加水分解した後、不溶物を汙別し、その汙液を吸着性樹脂に接触させて、苦味ペプチド及び混濁因子等を吸着除去して無味無臭の分解物を得る。本分解物は分子量1000ダルトン以下の画分の比率が75重量%以上であり、かつ3500ダルトン以上の画分の比率が1重量%未満とするのが好適である。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 次のa)～g)、

- a) カゼインの分解率が17～30%であること
- b) 分子量1000ダルトン以下の画分の比率が75% (重量) 以上であり、かつ分子量3500ダルトン以上の画分の比率が1% (重量) 未満であること
- c) カゼイン加水分解物に含まれる全アミノ酸の質量合計に占める遊離アミノ酸の質量合計の割合が10% (重量) 未満であること
- d) カゼイン加水分解物のアミノ酸スコアが100であること
- e) 風味が無味無臭であること
- f) カゼイン加水分解物の10% (重量) 水溶液を、セルの厚さ1cmのガラスセルを用いて540nmの波長で測定した透過率が99%以上であること
- g) pH4において100℃で10分間の加熱処理し、2か月間保存後に沈殿生成がなく、かつセルの厚さ1cmのガラスセルを用いて420nmの波長で測定した吸光度が0.250以下であること

の理化学的性質を有するカゼイン加水分解物。

【請求項2】 カゼインを吸着性樹脂により処理し、該処理カゼインに蛋白質分解酵素を添加して酵素分解し、酵素反応を停止し、濾過により不溶物を除去し、得られた濾液を吸着性樹脂で処理することを特徴とするカゼイン加水分解物の製造法。

【請求項3】 蛋白質分解酵素が、予め吸着性樹脂で処理される請求項2に記載のカゼイン加水分解物の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ほぼ無味無臭であり、低分子量であり、遊離アミノ酸含量が低く、アミノ酸スコアが100と優れており、溶液状態で透明であることから、飲料、栄養食品、各種一般食品等の蛋白質素材として広範に応用可能な新規なカゼイン加水分解物及びその効率的な製造方法に関するものである。

【0002】詳しくは、本発明は、カゼインの分解率が17～30%であること、分子量1000ダルトン以下の画分の比率が75% (重量) 以上であり、かつ分子量3500ダルトン以上の画分の比率が1% (重量) 未満であること、カゼイン加水分解物に含まれる全アミノ酸の質量合計に占める遊離アミノ酸の質量合計の割合が10% (重量) 未満であること、カゼイン加水分解物のアミノ酸スコアが100であること、風味が無味無臭であること、カゼイン加水分解物の10% (重量) 水溶液を、セルの厚さ1cmのガラスセルを用いて540nmの波長で測定した透過率が99%以上であること、及びpH4において100℃で10分間の加熱処理し、2か月間保存後に沈殿生成がなく、かつセルの厚さ1cmのガラスセルを用いて420nmの波長で測定した吸光度

が0.250以下であること、の理化学的性質を有するカゼイン加水分解物、並びにその製造法に関する。

【0003】本明細書において、百分率は、透過率を除き、特に断りのない限り、重量による表示である。また、本明細書において、アミノ酸遊離率は、カゼイン加水分解物、即ちペプチドと遊離アミノ酸との混合物 (乾燥物)、中の全アミノ酸の合計質量に対する遊離アミノ酸の合計質量の百分率を意味する。

【0004】

【従来の技術】蛋白質を加水分解して得られる、ペプチドと遊離アミノ酸との混合物は、単独の蛋白質、アミノ酸混合物等と比較して種々の優位性があるため、各方面から注目されており、例えば、栄養学的には、ジペプチド及びトリペプチドはアミノ酸とは別の経路で、その構成アミノ酸の混合物よりも速く吸収されること、蛋白質の加水分解物は、その構成アミノ酸混合物と比べて個々のアミノ酸の吸収量に変動がないこと等が明らかになっている [代謝、第27巻、第993～1000ページ、1990年]。

【0005】また、食品に含有される蛋白質は、人にとって異種蛋白質であり、消化が不十分な状態で抗原性を有したまま体内に吸収された場合、アレルギー症状を呈し、場合によっては生命の危険を招くケースも存在する。この一つの解決策として食品中の蛋白質を酵素により加水分解し、抗原性を低減又は消失させることが行われており、この蛋白質分解物を配合した食品も増加している [特開平4-248959号公報; ジャパニーズ・ジャーナル・オブ・デイルー・アンド・フード・サイエンス (Japanese Journal of Dairy and Food Science)、第33巻、第A-5～A-12ページ、1984年]。

【0006】以上のとおり、ジペプチド及びトリペプチド等の低分子量ペプチドが、消化吸収性及び栄養生理の面から極めて有効であることが知られており、ジペプチド及びトリペプチドを主体とした低分子量ペプチド組成物が蛋白質素材として広く求められている。

【0007】最近、低分子量ペプチド組成物を配合したスポーツ飲料、疲労回復飲料等の清涼飲料タイプの飲料が多く開発されている。これらの清涼飲料タイプの飲料は、pH4前後程度の酸性域に調整され、ホットパック、レトルト等の方法により加熱殺菌され、充填され、製品となり、充填後の流通期間は、常温流通で通常2か月～1年間程度である。これらの飲料は、視覚的な清涼感を付与するために透明又は半透明の液体であることが要求されているが、従来の製品は、加熱殺菌直後はいうまでもなく、この流通期間中に混濁、沈殿、凝集、褐変等が発生し易く、製品価値を著しく低下させるという問題があった。

【0008】更に、最近、スポーツ栄養学の発達により各種アミノ酸、ペプチドの運動能力への効果が明らかに

されており、スポーツ選手用栄養補助食品等に配合する低分子量ペプチド組成物にも、アミノ酸スコア100であることが強く求められていた。

【0009】一方、低分子量ペプチド組成物を得る目的で、蛋白質を酵素等を使用して常法により加水分解し、蛋白質加水分解を製造した場合、原料蛋白質に由来する素材臭、素材味、加水分解により生じた種々の呈味性ペプチド等により、不快臭及び不快味が発生し、これが蛋白質加水分解の広範な利用を妨げる大きな問題であった。

【0010】従来、風味が改善されたカゼイン加水分解物が幾つか開発されているが、これらを例示すれば次のとおりである。

(1) カゼインを乳酸菌由来プロテアーゼ、乳酸菌、乳酸菌破砕物のいずれか一つ又はこれらの混合物で処理することにより、素材臭が低減された風味良好なカゼイン加水分解物が開示されている(特開平7-303455号公報。以下、従来技術1と記載する。)

(2) 分解率、分子量分布が特定され、抗原性が低減された風味良好なカゼイン加水分解物が開示されている(特開平8-228692号公報。以下、従来技術2と記載する。)

(3) 溶液は透明であり、保存安定性に優れ、カゼイン加水分解物1g中に含まれるトリプトファンが4mg以下である無味無臭のカゼイン加水分解物が開示されている(特開平9-28306号公報。以下、従来技術3と記載する。)

(4) 苦味及び抗原性のないカゼイン加水分解物が開示されている(特公昭54-36235号公報。以下、従来技術4と記載する。)

(5) 苦味、不快味が少ない低アレルギー性カゼインペプチド組成物及びその製造方法が開示されている(特開平6-113893号公報。以下、従来技術5と記載する。)

【0011】しかしながら、前記従来技術1のようにカゼインを軽度分解したカゼイン加水分解物は、風味については満足できるが、分解率が低いため、消化吸収に優れた低分子量ペプチドの含量がほとんど含有されていないばかりではなく、低いpH域での溶液熱安定性がないため、最近需要の高まりつつある酸性飲料へ使用できないという欠点を有していた。

【0012】また、前記従来技術2のカゼイン加水分解物は、抗原性が低く、風味が良好で、消化吸収性が良い点において優れているが、無味無臭ではないので、応用範囲が限定され、加熱処理後の流通期間中に生じる混濁、沈殿、凝集、褐変等の問題があった。

【0013】前記従来技術3は、溶液は透明であり、無味無臭であり、加熱処理後の保存安定性の問題も解決しているカゼイン加水分解物であるが、加水分解後に風味を無味無臭になるまで樹脂処理するためにカゼイン加水

分解物1g中に含まれるトリプトファンが4mg以下となり、アミノ酸スコア100を満たさないという問題を有していた。

【0014】前記従来技術3における蛋白質加水分解物の風味改善のために、従来から食品工業、化学工業等で広く脱臭、脱色、脱苦味等の処理に用いられている活性炭等の吸着剤を蛋白質加水分解物に適用した処理が行われている。しかしながらこの処理は、原料蛋白質に由来する素材味及び素材臭を全く除去することなく、加水分解した後に吸着剤と接触させて風味の改善を行うため、加水分解液を多量の吸着剤と長時間接触させなければならない。従って、吸着剤との親和性が高く、特に吸着されやすいアミノ酸を含むペプチドが、過度に吸着され、不快な味、不快な臭気、色ばかりではなく、ある種のアミノ酸、有用なペプチド等も一部に除去され、その結果、製造される蛋白質加水分解物の回収率低下を招くばかりでなく、有用成分であるペプチドの喪失により栄養学的及び機能的な損失を招いていた。

【0015】また、必須アミノ酸であるトリプトファンは、疎水性の吸着剤で吸着されやすいため、吸着剤処理後の蛋白質加水分解物がアミノ酸スコア100を満たさないという問題がしばしば発生していた。

【0016】また前記従来技術4においては、抗原性を低下させると共に苦味を低下させるために、40%の遊離アミノ酸量まで高度に加水分解したカゼイン加水分解物を製造する方法を開示しているが、遊離アミノ酸が大量に生成しているため、その呈味性により清涼飲料への使用には全く不適当な風味を有するばかりでなく、加熱による褐変が顕著であるという欠点を生じていた。

【0017】更に、前記従来技術5においては、「苦味価」を導入し、これを指標として蛋白質分解酵素の組合せをスクリーニングし、アレルギー性が低減し、苦味及び不快味のない低アレルギー性カゼインペプチドを開示しているが、その遊離アミノ酸量は30~55%と高値であり、前記従来技術4と同様の問題点を有していた。

【0018】これらの従来技術から明らかなとおり、カゼインを原料とする低分子量ペプチドの風味を改善し、保存期間中の混濁、沈殿、凝集、褐変等の問題を解決し、アミノ酸スコア100を確保することは種々の検討にもかかわらず非常に困難であった。

【0019】

【発明が解決しようとする課題】前記従来技術においては、風味は満足できるが、分解率が低く、低pH域での溶液熱安定性に問題を残すカゼイン加水分解物、低抗原性で風味は良好であるが無味無臭ではないカゼイン加水分解物、無味無臭で保存安定性も優れているがアミノ酸スコア100を満たさないカゼイン加水分解物、苦味及び抗原性はないが遊離アミノ酸含量が高く呈味性に問題のあるカゼイン加水分解物、苦味、不快味は少ないが、遊離アミノ酸含量が高く呈味性に問題のある低アレルギー

ン性カゼインペプチド組成物が開示されているのみであり、無味無臭であり、加熱殺菌後の保存安定性に優れ、アミノ酸スコア100を満たすカゼイン加水分解物については、従来知られていなかった。

【0020】更に、従来、分解率が17～30%であり、分子量1000ダルトン以下の画分の比率が75%（重量）以上であり、かつ分子量3500ダルトン以上の画分の比率が1%（重量）未満であり、アミノ酸遊離率が10%（重量）未満であり、アミノ酸スコアが100であり、無味無臭であり、溶液状態で透明であり、溶液状態での長期保存においても沈殿等が生じない、いわゆる保存安定性に優れ、優れた消化吸収性を有するカゼイン加水分解物は知られていなかった。

【0021】従って、優れた栄養価を有するカゼインを原料として用い、溶液状態で保存される飲料等の種々の食品に、広範囲に応用可能である、透明であり、保存安定性に優れ、アミノ酸スコア100を有し、風味及び消化吸収性をも併せて改善されたカゼイン加水分解物が要望されていた。

【0022】本発明者らは、前記従来技術に鑑みて、従来製品の有する前記各種問題点を解決し得る新しい製品を開発することを目的として鋭意研究を積み重ねた結果、原料蛋白質に由来する素材臭、素材味等を予め除去することにより、加水分解反応後の蛋白質加水分解液と吸着性樹脂との接触を従来法よりも軽度抑制した場合であっても、良好な風味と保存安定性が得られるという事実を見出した。

【0023】即ち、本発明者らは、カゼインを吸着樹脂で処理し、該処理済みカゼインを酵素により加水分解し、加水分解物より不溶物を濾過し、濾液を吸着樹脂で処理することにより、溶出物質として得られる特定の理化学的性質を有するカゼイン加水分解物が、従来のカゼイン加水分解物では成し得なかった溶液状態で透明で、保存安定性に優れ、アミノ酸スコア100を有し、無味無臭であり、かつ消化吸収性に優れるという良好な特性を具備すること、及び該カゼイン加水分解物を安定して製造する方法を見出し、本発明を完成した。

【0024】本発明の目的は、低分子量で、消化吸収性に優れ、低アミノ酸遊離率で、アミノ酸スコア100を有し、ほぼ無味無臭であり、溶液状態で透明で、かつ溶液状態での長期保存においても混濁、沈殿、凝集、褐変等を生じない、いわゆる保存安定性に優れた特性を具備したカゼイン加水分解物を提供することである。

【0025】また、本発明の他の目的は、低分子量で、消化吸収性に優れ、低アミノ酸遊離率で、アミノ酸スコア100を有し、風味がほとんど無味無臭であり、溶液状態で透明で、かつ溶液状態での長期保存においても混濁、沈殿、凝集、褐変等が生じない、いわゆる保存安定性に優れた特性を具備したカゼイン加水分解物の製造方法を提供することである。

#### 【0026】

【課題を解決するための手段】前記課題を解決する本発明の第一の発明は、次のa)～g)、

- a) カゼインの分解率が17～30%であること
- b) 分子量1000ダルトン以下の画分の比率が75%（重量）以上であり、かつ分子量3500ダルトン以上の画分の比率が1%（重量）未満であること
- c) カゼイン加水分解物に含まれる全アミノ酸の質量合計に占める遊離アミノ酸の質量合計の割合が10%（重量）未満であること
- d) カゼイン加水分解物のアミノ酸スコアが100であること
- e) 風味が無味無臭であること
- f) カゼイン加水分解物の10%（重量）水溶液を、セルの厚さ1cmのガラスセルを用いて540nmの波長で測定した透過率が99%以上であること
- g) pH4において100℃で10分間の加熱処理し、2か月間保存後に沈殿生成がなく、かつセルの厚さ1cmのガラスセルを用いて420nmの波長で測定した吸光度が0.250以下であること

の理化学的性質を有するカゼイン加水分解物である。

【0027】前記課題を解決する本発明の第二の発明は、カゼインを吸着性樹脂により処理し、該処理カゼインに蛋白質分解酵素を添加して酵素分解し、酵素反応を停止し、濾過により不溶物を除去し、得られた濾液を吸着性樹脂で処理することの特徴とするカゼイン加水分解物の製造法であり、蛋白質分解酵素が、予め吸着性樹脂で処理されることを望ましい態様としてもいる。

#### 【0028】

【発明の実施の形態】次に本発明について詳記するが、本発明の理解を容易にするために、最初に本発明の第二の発明、即ち、カゼイン加水分解物の製造方法（以下、本発明の方法と略記する。）から説明する。

【0029】本発明の方法に使用される出発原料のカゼインは、市販品若しくは牛乳、脱脂乳等から公知の方法により分離された乳酸カゼイン、塩酸カゼイン等の酸カゼイン、ナトリウムカゼイネイト、カリウムカゼイネイト、カルシウムカゼイネイト等のカゼイネイト、又はこれらの任意の混合物である。

【0030】この原料カゼインを水又は温湯に分散し、溶解する。該溶解液の濃度は格別の制限はないが、通常蛋白質換算で5～15%前後の濃度範囲にするのが効率性及び操作性の点から望ましい。

【0031】前記カゼイン溶液を80～85℃で10分間程度加熱殺菌することが、雑菌汚染による変敗防止の点から望ましい。次いで、殺菌した前記カゼイン溶液を吸着性樹脂で処理する。

【0032】本発明の方法に使用される吸着性樹脂としては、ダウエックスS-112（ダウケミカル社製）、XAD-7（オルガノ社製）、KS-35（北越炭素社

製)等の市販品を例示することができる。

【0033】本発明の方法におけるカゼインの吸着性樹脂での処理は、吸着性樹脂をカゼイン溶液へ投入して所定時間接触させるバッチ式、吸着性樹脂を充填したカラムへカゼイン溶液を通液するカラム式のいずれの方式でも可能であり、バッチ式では、前記カゼイン溶液に、その味及び臭いの成分を吸着除去するために十分な量の吸着性樹脂を、その吸着能を考慮して添加し、吸着処理後の吸着性樹脂を濾過等により分離する。

【0034】また、カラム式では、吸着性樹脂を充填したカラムに、その吸着能を考慮して前記カゼイン溶液を、その味及び臭いの成分を吸着除去するために十分な流速で通液し、吸着処理後のカゼイン溶液を回収することにより実施することができる。具体的には、バッチ式で、吸着性樹脂としてKS-35(北越炭素社製)を使用した場合には、カゼイン(蛋白質含量85%)1重量部に対して吸着性樹脂0.3重量部以上を使用することにより、その味及び臭いの成分を吸着除去することができる。

【0035】次いで、必要があれば、アルカリ又は酸溶液を用いて、吸着性樹脂で処理されたカゼイン溶液のpHを、使用する蛋白質分解酵素の至適pH付近に調整することもできる。このpH調整のためのアルカリ溶液としては水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸カリウム等を、酸溶液としては塩酸、クエン酸、硫酸、酢酸、リンゴ酸、グルコン酸等をそれぞれ例示することができる。

【0036】蛋白質分解酵素を4〜10℃の冷水に分散し、溶解する。該溶解液の濃度は格別の制限はないが、通常3〜10%程度の酵素濃度とすることが効率性及び操作性の点から望ましい。

【0037】本発明の方法で使用する蛋白質分解酵素はエンドプロテアーゼであり、1種類又は複数種類組み合わせて使用できる。

【0038】本発明で使用する蛋白質分解酵素としては、動物由来(例えば、トリプシン、キモトリプシン、ペプシン等)、植物由来(例えば、パパイン、ブロメライン、フィシン等)、微生物由来(例えば、乳酸菌、酵母、カビ、枯草菌、放線菌等)のエンドプロテアーゼ、及びこれらの粗精製物、菌体破碎物等を例示することができる。これらの酵素の市販品としては、ビオプラザー(長瀬生化学工業社製)、プロテアーゼN(天野製薬社製)、PTN(ノボ・ノルディスク社製)、ペプシン(ボルファング・ミュールバウアー社製)、パパイン(アリ社製)等を例示することができる。

【0039】本発明の方法においては、使用する蛋白質分解酵素を吸着性樹脂で処理することもできる。本発明の方法に使用される吸着性樹脂としては、ダウエックスS-112(ダウケミカル社製)、XAD-7(オルガノ社製)、KS-35(北越炭素社製)等の市販品を例

示することができる。

【0040】本発明の方法における蛋白質分解酵素の吸着性樹脂での処理は、吸着性樹脂を蛋白質分解酵素溶液へ投入して所定時間接触させるバッチ式、吸着性樹脂を充填したカラムへ蛋白質分解酵素溶液を通液するカラム式のいずれの方式でも可能である。

【0041】バッチ式では、前記蛋白質分解酵素溶液に、その味及び臭いの成分を吸着除去するために十分な量の吸着性樹脂を、その吸着能を考慮して添加し、吸着処理後の吸着性樹脂を濾過等により分離する。また、カラム式では、吸着性樹脂を充填したカラムに、その吸着能を考慮して前記蛋白質分解酵素溶液を、その味及び臭いの成分を吸着除去するために十分な流速で通液し、吸着処理後の蛋白質分解酵素溶液を回収することにより実施することができる。

【0042】具体的には、バッチ式の場合、吸着性樹脂としてKS-35(北越炭素社製)を使用した場合に、蛋白質分解酵素(蛋白質含量40%)1重量部に対して吸着性樹脂0.2重量部以上を使用することにより、その味及び臭いの成分を吸着除去することができる。

【0043】次いで、前記吸着性樹脂で処理したカゼイン溶液に蛋白質分解酵素溶液又は前記吸着性樹脂で処理した蛋白質分解酵素溶液を添加する。複数種類の蛋白質分解酵素を添加する場合には、カゼイン加水分解物に所望の分解率及び分子量分布を達成できるならば、一括添加、又は少量に分割して逐次添加することもできる。

【0044】前記出発原料に対する酵素の使用量は、基質濃度、酵素力価、反応温度及び反応時間により異なるが、一般的には出発原料中の蛋白質1g当り1000〜10000活性単位の割合で酵素を単独、又は複数組み合わせて添加する。

【0045】酵素反応の温度は格別の制限はなく、酵素作用の発現する最適温度範囲を含む実用に供せられ得る範囲から選ばれ、通常30〜70℃の範囲から選ばれる。温度を50〜60℃の範囲に維持することで酵素反応中の腐敗を防止することができる。

【0046】本発明のカゼイン加水分解物の加水分解反応時間は、使用酵素の種類及び組合せ、反応温度、初発pH等の反応条件によって進行状態が異なり、酵素反応の反応継続時間を一定とすると製造バッチ毎に異なる理化学的性質を有する分解物が生じる可能性があるため、一概に決定できない。従って、酵素反応をモニターし、反応継続時間を決定する必要がある。

【0047】加水分解の程度は、加水分解に伴って発生する不溶物を濾過により除去し、濾液中に含まれるカゼイン加水分解物が、分子量1000ダルトン以下の画分の比率が75%以上であり、分子量3500ダルトン以上の画分の比率が1%未満であり、かつ分解率が17〜30%であり、アミノ酸遊離率が10%未満の範囲で反

応温度、反応時間、酵素添加量等の反応条件を設定する。

【0048】酵素反応の停止は、分解液中の酵素の失活又は除去により行われ、常法による加熱失活処理、限外濾過膜等を用いた分解液からの酵素の除去により実施することができる。加熱失活処理の加熱温度と保持時間は、使用した酵素の熱安定性を考慮し、十分に失活できる条件を設定することができるが、例えば、80～130℃の温度範囲で30分間～2秒間の保持温度で行うことができる。

【0049】分解液中の酵素の失活後、常法により分解液を冷却し、濾過により前記カゼイン加水分解反応終了後の溶液中に存在する加水分解反応及び／又は酵素加熱失活時に生成した不溶物を除去する。濾過の方法は、例えば、珪藻土濾過、精密濾過、限外濾過等を例示することができる。

【0050】次いで、前記不溶物を除去した濾液を吸着性樹脂により接触処理し、樹脂を分離し、保存安定性に優れており、無味無臭であり、アミノ酸スコア100であり、かつ消化吸収性に優れた本発明のカゼイン加水分解物を溶液状態で得ることができる。濾液中には加水分解により生じた苦味ペプチド等の呈味性ペプチドの他、保存期間中に、混濁、沈殿、凝集、褐変等を惹起する因子が若干残存しているため、これらをこの接触処理工程により除去する。

【0051】本発明の方法における前記不溶物を除去した濾液の吸着性樹脂での処理は、吸着性樹脂を前記不溶物を除去した濾液へ投入して所定時間接触させるバッチ式、吸着性樹脂を充填したカラムへ前記不溶物を除去した濾液を通液するカラム式のいずれの方式でも行うことができる。

【0052】バッチ式では、前記不溶物を除去した濾液に、そのアミノ酸スコア100を確保しながら、苦味ペプチドを初めとする呈味性ペプチド、及び混濁、沈殿、凝集、褐変等を惹起する因子を所定量に低減するために十分な量の吸着性樹脂を、その吸着能を考慮して添加し、吸着処理後の吸着性樹脂を濾過等により分離する。

【0053】また、カラム式では、吸着性樹脂を充填したカラムに、その吸着能を考慮して、前記不溶物を除去した濾液を、そのアミノ酸スコア100を確保しながら、苦味ペプチド等の呈味性ペプチド、及び混濁、沈殿、凝集、褐変等を惹起する因子を所定量に低減するために十分な流速で通液し、吸着処理後の蛋白質分解酵素溶液を回収することにより実施することができる。

【0054】具体的には、カラム式の場合、吸着性樹脂としてKS-35（北越炭素社製）を使用し、カゼイン加水分解物（蛋白質含量88%）の濃度10%溶液を吸着性樹脂を充填したカラムに $SV=10\text{ h}^{-1}$ 以上の流速で通液することにより、そのアミノ酸スコア100を確保しながら、苦味ペプチドを初めとする呈味性ペプチ

ド、及び混濁、沈殿、凝集、褐変等を惹起する因子を所定量に低減することができる。

【0055】バッチ式の場合は、吸着性樹脂との接触により行うことができる。吸着性樹脂としてはダウエックスS-112（ダウケミカル社製）、XAD-7（オルガノ社製）、KS-35（北越炭素社製）等の市販品を例示することができる。

【0056】得られたカゼイン加水分解物を含有する溶液は、このまま使用することも可能であり、また、必要に応じて、この溶液を公知の方法により濃縮した濃縮液、更に、この濃縮液を公知の方法により乾燥した粉末、として使用することもできる。

【0057】次に、本発明の第一の発明について記載する。前記のとおり本発明の第二の発明により得られたカゼイン加水分解物は、後記する実施例から明らかなとおり、次のa)～g)の理化学的性質を有している。

【0058】a) カゼインの分解率が17～30%である。

b) 図1に示すとおり、分子量1000ダルトン以下の画分の比率が75%以上であり、かつ分子量3500ダルトン以上の画分の比率が1%未満である。図1は、実施例1により得られた本発明のカゼイン加水分解物の分子量分布を示し、縦軸及び横軸は、それぞれ分布割合及び分子量を示す。

c) カゼイン加水分解物に含まれる全アミノ酸の合計質量に占める遊離アミノ酸の合計質量の割合が10%（重量）未満である。

d) カゼイン加水分解物のアミノ酸スコアが100である。

e) 風味が無味無臭である。

f) カゼイン加水分解物の10%（重量）水溶液をセルの厚さ1cmのガラスセルを用いて540nmの波長で測定した透過率が99%以上である。

g) pH4において100℃で10分間加熱処理した場合、2か月間保存後に沈殿生成がなく、かつセルの厚さ1cmのガラスセルを用いて420nmの波長で測定した吸光度が0.250以下である。

【0059】前記a)～g)に示したとおり、本発明のカゼイン加水分解物は、特定の分解率により分子量1000ダルトンを越えるペプチドを低減し、分子量1000ダルトン以下の画分の比率を75%以上、分子量3500ダルトン以上の画分の比率が1%未満とすることにより、腸管からの消化吸収性に優れ、アミノ酸の遊離を抑制してアミノ酸遊離率を10%未満とし、原料カゼイン及びカゼイン加水分解濾液の吸着性樹脂への接触により風味が無味無臭でありながらアミノ酸スコア100を保持し、かつ濾過処理及び原料カゼイン及び加水分解、濾過後のカゼイン加水分解濾液の吸着性樹脂への接触により不溶性物質及び混濁、沈殿、凝集、褐変等を惹起する因子を除去することにより溶液状態で透明であり、加

熱殺菌後の溶液状態での保存安定性に優れるという良好な性質を有するカゼイン加水分解物である。

【0060】本発明のカゼイン加水分解物は、消化吸収性に優れ、風味が無味無臭であり、アミノ酸スコア100を保持し、溶液状態で透明であり、かつ溶液状態での長期保存においても混濁、沈殿、凝集、褐変等を生じない、いわゆる保存安定性に優れているという従来のカゼイン加水分解物にはない特徴を有している。

【0061】次に試験例を示して本発明を詳細に説明するが、本発明においては、次の試験方法を採用した。

#### (1) 蛋白質の分解率の測定方法

ケルダール法により試料の全窒素を、フォルモール滴定法により試料のフォルモール態窒素を、それぞれ測定し、これらの値から次式により蛋白質の分解率を算出した。

分解率(%) = (フォルモール態窒素/全窒素) × 100

#### 【0062】(2) 分子量分布の測定方法

高速液体クロマトグラフィーにより測定した(宇井信生ら編、「タンパク質・ペプチドの高速液体クロマトグラフィー」、化学増刊102号、第241ページ、株式会社化学同人、1984年)。ポリハイドロキシエチル・アスパルタミド・カラム [Poly Hydroxyethyl Aspartamide Column: ポリ・エル・シー (PolyLC) 社製。直径4.6mm及び長さ200mm] を用い、20mM塩化ナトリウム、50mMギ酸により溶出速度0.4ml/分で溶出した。検出は、UV検出器(島津製作所社製)を用い、データ解析はGPC分析システム(島津製作所社製)を使用した。

#### 【0063】(3) アミノ酸組成の測定方法

トリプトファン、システイン及びメチオニン以外のアミノ酸については、試料を6規定の塩酸で110℃、24時間加水分解し、トリプトファンについては、水酸化バリウムで110℃、22時間アルカリ分解し、システイン及びメチオニンについては、過ギ酸処理後、6規定の塩酸で110℃、18時間加水分解し、それぞれアミノ酸自動分析機(日立製作所社製。835型)により分析し、アミノ酸の質量を測定した。

#### 【0064】(4) アミノ酸遊離率の算定方法

試料中の各アミノ酸組成を前記(3)の方法により測定し、これを合計して試料中の全アミノ酸の質量を算出する。次いで、スルホサリチル酸で試料を除蛋白し、残留する各遊離アミノ酸の質量を前記(3)の方法により測定し、これを合計して試料中の全遊離アミノ酸の質量を算出する。これらの値から、試料中の遊離アミノ酸含有率を次式により算出した。

アミノ酸遊離率(%) = (全遊離アミノ酸の質量/全アミノ酸の質量) × 100

#### (5) アミノ酸スコアの算定方法

前記アミノ酸組成の測定方法により測定された試料の各

アミノ酸の質量、ケルダール法により求めた試料の全窒素量、及び1973年FAO/WHOアミノ酸評点パターン(一般用)(科学技術庁資源調査会・資源調査所編、「改訂日本食品アミノ酸組成表」、第211~217ページ、大蔵省印刷局発行、昭和61年)を使用して、各アミノ酸ごとに1973年のアミノ酸評点パターンに対する割合(%)を次式により算出し、その中の最低値をもってアミノ酸スコアとした。尚、最低値が100を上回る場合のアミノ酸スコアは通例により100とした。

【0065】1973年の評点パターンに対する割合(%) = 試料中の各アミノ酸含量(mg/gN)/評点パターンの当該アミノ酸量(mg/gN) × 100。

#### 【0066】(6) 各試料の風味(呈味)試験

調製した各試料を20歳から40歳までの男女各20人からなるパネルにより、呈味の有無及びその強さについて、次の評価方法により官能的に試験した。各試料を

0点: 呈味なし

1点: 呈味弱い

2点: 呈味やや強い

3点: 呈味強い

の4段階に評価し、各試料の評価点の平均値を算出し、

無味: 0.5点未満

弱い呈味: 0.5点以上1.5未満

やや強い呈味: 1.5点以上2.5未満

強い呈味: 2.5点以上3.0未満

の基準により判定した。

#### 【0067】(7) 各試料の風味(臭い)試験

調製した各試料を20歳から40歳までの男女各20人からなるパネルにより、臭いの有無及びその強さについて、次の評価方法により官能的に試験した。各試料を

0点: 臭いなし

1点: 臭い弱い

2点: 臭いやや強い

3点: 臭い強い

の4段階に評価し、各試料の評価点の平均値を算出し、

無臭: 0.5点未満

弱い臭い: 0.5点以上1.5未満

やや強い臭い: 1.5点以上2.5未満

強い臭い: 2.5点以上3.0未満

の基準により判定した。

#### 【0068】(8) 透過率の測定方法

カゼイン加水分解物試料を、固形分濃度10%で水に溶解し、セルの厚さ1cmのガラスセルを用い、分光光度計U-3200型(日立製作所社製)により波長540nmによりその透過率を測定した。

【0069】(9) 保存安定性(沈殿生成)試験方法  
カゼイン加水分解物の試料を、クエン酸添加によりpH4に調整し、固形分濃度10%で水に溶解し、250mlの透明ガラスビンに充填し、100℃で10分間加熱して水冷し、37℃の恒温器内で2か月間保存し、沈殿



の生成を肉眼観察し、沈殿有り(+)及び沈殿無し(-)で表示した。

【0070】(10) 保存安定性(着色度)試験

カゼイン加水分解物の試料を、クエン酸添加によりpH4に調整し、固形分濃度10%で水に溶解し、250mlの透明ガラスビンに充填し、100℃で10分間加熱して水冷し、37℃の恒温器内で2か月間保存し、保存液の上澄液をセルの厚さ1cmのガラスセルを用い、分光光度計U-3200型(日立製作所社製)により波長420nmによりその吸光度を測定した。

【0071】試験例1

この試験は、本発明のカゼイン加水分解物と従来技術により作成したカゼイン加水分解物とについて、その分解率、分子量1000ダルトン以下の画分の比率、分子量3500ダルトン以上の画分の比率、アミノ酸遊離率、アミノ酸スコア、風味(呈味、臭い)、透過率、及び保存安定性(沈殿生成、着色度)について比較検討した。

【0072】1) 試料の調製

次の従来技術の記載に基づいて調製した4種の試料及び本発明の方法により調製した1種の試料の合計5種の試料(試料番号1~5)を調製した。

試料1: 本発明の実施例1で得られた本発明カゼイン加水分解物。

試料2: 従来技術1の明細書に記載の実施例1により、カゼインをFCH(ラクトバチルス・ヘルベティカス菌体濃縮凍結液)で分解して得られたカゼイン加水分解物。

試料3: 従来技術2の明細書に記載の実施例1により、カゼインをバイオプレーゼsp-20(長瀬生化学工業社製)、プロテアーゼN(天野製薬社製)、及びPTN6.0S(ノボ・ノルディスク社製)で分解して得られ

たカゼイン加水分解物。

試料4: 従来技術3の明細書に記載の実施例1により、カゼインをバイオプレーゼsp-20(長瀬生化学工業社製)、プロテアーゼN(天野製薬社製)、及びPTN6.0S(ノボ・ノルディスク社製)で分解し、アンバーライトXAD-7(オルガノ社製)で処理して得られたカゼイン加水分解物。

試料5: 従来技術4の明細書に記載の実施例1により、カゼインをラクトバチルス・ヘルベティカス(ハンゼン社市販菌株)粉末破砕物、パンクレアチン(天野製薬社製)、及びプロテアーゼA(天野製薬社製)で分解して得られたカゼイン加水分解物。

【0073】2) 試験方法

各試料の分解率、分子量1000ダルトン以下の画分の比率、分子量3500ダルトン以上の画分の比率、アミノ酸遊離率、アミノ酸スコア、風味(呈味、臭い)、透過率、及び保存安定性(沈殿生成、着色度)を、いずれも前記の試験方法により測定して試験した。

【0074】3) 試験結果

この試験の結果は、表1に示すとおりである。表1から明らかなとおり、分解率を17~30%、分子量1000ダルトン以下の画分の比率を75%以上、分子量3500ダルトン以上の画分の比率を1%未満、アミノ酸遊離率10%未満、アミノ酸スコア100、無味無臭であり、透過率が99%以上、及び保存安定性に優れるという良好な性質を併せ持つカゼイン加水分解物は、本発明のカゼイン加水分解物のみであることが判明した。

【0075】尚、出発原料の種類及び製造法を変更して試験したが、ほぼ同様な結果が得られた。

【0076】

【表1】

試験項目	試料1	試料2	試料3	試料4	試料5
分解率(%)	23.1	7.1	25.6	24.1	42.7
1000以下画分(%)	83.0	6.1	84.1	83.1	95.1
3500以上画分(%)	0.2	89.0	0.1	0.1	0
遊離率(%)	5.1	0.8	6.8	6.7	63.0
アミノ酸スコア	100	100	100	41	100
風 臭い	0.36	0.52	2.21	0.38	2.66
味 呈味	0.36	0.55	2.28	0.36	2.89
透過率(%)	99.3	0.1	99.4	99.4	99.1
安定性 沈殿生成	-	+	+	-	+
着色度	0.222	1.843	0.341	0.220	0.467

(注)

- 1) 「1000以下画分」は、分子量1000ダルトン以下の画分を意味する。
- 2) 「3500以上画分」は、分子量3500ダルトン以上の画分を意味する。
- 3) 「遊離率」は、アミノ酸の遊離率を意味する。
- 4) 「安定性」は、保存中の安定性を意味する。

## 【0077】試験例2

この試験は、アミノ酸スコア、風味(呈味、臭い)、及び保存安定性(沈殿生成、着色度)を指標として、カゼイン加水分解物の適正な分解率、分子量1000ダルトン以下の画分の比率、分子量3500ダルトン以上の画分の比率、アミノ酸遊離率、及び透過率を調べるために行った。

## 【0078】1) 試料の調製

酵素反応の停止時期を変更し、表2に示すとおり、カゼイン加水分解物の分解率を16%、17%、20%、25%、30%、33%と変更したことを除き、実施例1と同一の方法により6種の試料(試料番号6~11)を調製した。

## 【0079】2) 試験方法

各試料の分解率、分子量1000ダルトン以下の画分の比率、分子量3500ダルトン以上の画分の比率、アミ

ノ酸遊離率、アミノ酸スコア、風味(呈味、臭い)、透過率、及び保存安定性(沈殿生成、着色度)を、いずれも前記の試験方法により測定して試験した。

## 【0080】3) 試験結果

この試験の結果は、表2に示すとおりである。表2から明らかなとおり、アミノ酸スコア100、無味無臭、及び保存安定性に優れたカゼイン加水分解物は、分解率17~30%、分子量1000ダルトン以下の画分の比率を75%以上、分子量3500ダルトン以上の画分の比率を1%未満、アミノ酸遊離率10%未満、及び透過率99%以上であることが判明した。

【0081】尚、カゼインの種類、蛋白質分解酵素の種類、及び吸着性樹脂の種類を適宜変更して試験したが、ほぼ同様な結果が得られた。

## 【0082】

## 【表2】

試験項目		試料6	試料7	試料8	試料9	試料10	試料11
分解率(%)		16	17	20	25	30	33
1000以下画分(%)		72.1	75.1	80.3	84.1	87.5	88.6
3500以上画分(%)		1.7	0.8	0.4	0.1	0.1	0.1
遊離率(%)		3.1	3.5	4.3	5.5	8.1	11.8
アミノ酸スコア		100	100	100	100	100	100
風味	臭い	0.22	0.22	0.31	0.37	0.47	0.54
	呈味	0.21	0.20	0.29	0.36	0.48	0.55
透過率(%)		98.7	99.0	99.3	99.4	99.4	99.4
安定性	沈殿生成	+	-	-	-	-	-
	着色度	0.190	0.198	0.215	0.237	0.247	0.251

(注) 表1の注と同一。

#### 【0083】試験例3

この試験は、アミノ酸スコア、風味（呈味、臭い）、及び保存安定性（沈殿生成、着色度）を指標としてカゼイン加水分解物の製造方法の条件を調べるために行った。

#### 【0084】1) 試料の調製

表3に示すとおり、カゼイン、蛋白質分解酵素、又は分解失活汙液に対する吸着性樹脂の処理の有無が異なることを除き、実施例1と同一の方法により、実施例1と同一の分解率、分子量1000ダルトン以下の画分の比率、分子量3500ダルトン以上の画分の比率、アミノ酸遊離率、及び透過率の8種の試料（試料番号12～19）を調製した。

#### 【0085】2) 試験方法

各試料のアミノ酸スコア、風味（呈味、臭い）、及び保存安定性（沈殿生成、着色度）を、いずれも前記の試験方法により測定して試験した。

#### 【0086】3) 試験結果

この試験の結果は、表3に示すとおりである。表3から明らかとなり、カゼイン、又はカゼイン及び蛋白質分解酵素の双方に対して吸着性樹脂による処理を加水分解前に実施しない場合には、分解失活汙液に対する吸着性

樹脂による処理を実施しても、アミノ酸スコア100を保持するために分解失活汙液と吸着性樹脂とを短い接触時間で処理するため、無味無臭の分解物は得られなかった。

【0087】また、汙液に対する吸着性樹脂による処理を実施しない場合には、カゼイン、又はカゼイン及び蛋白質分解酵素の双方に対して吸着性樹脂による処理を加水分解前に実施しても、加水分解や加熱により生じる臭気及び呈味により無味無臭の分解物が得られないばかりではなく、保存安定性も悪化した。従って、アミノ酸スコア100、無味無臭、及び保存安定性に優れたカゼイン加水分解物を製造するためには、カゼイン、又はカゼイン及び蛋白質分解酵素の双方に対して吸着性樹脂による処理を加水分解前に実施し、かつ汙液に対する吸着性樹脂による処理を実施する必要があることが判明した。

【0088】尚、カゼインの種類、蛋白質分解酵素の種類、及び吸着性樹脂の種類を適宜変更して試験したが、ほぼ同様な結果が得られた。

#### 【0089】

【表3】

試 験 項 目		試料12	試料13	試料14	試料15	試料16	試料17	試料18	試料19
樹脂 処理 有無	対カゼイン	無	有	無	有	無	有	無	有
	対酵素	無	無	有	有	無	無	有	有
	対分解液	無	無	無	無	有	有	有	有
アミノ酸スコア		100	100	100	100	100	100	100	100
風 味	臭い	2.24	1.85	2.02	1.77	1.42	0.36	0.85	0.25
	呈味	2.30	1.92	2.11	1.81	1.38	0.36	0.79	0.27
透過率 (%)		99.2	99.3	99.3	99.4	99.4	99.5	99.5	99.5
安定性	沈殿生成	+	+	+	+	-	-	-	-
	着色度	0.342	0.331	0.330	0.328	0.210	0.222	0.218	0.228

(注)

1) 「樹脂処理有無」は、吸着性樹脂処理の有無を意味する。

2) 「安定性」は表1の注と同一。

【0090】次に、実施例を示して本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0091】

【実施例】実施例1

市販カゼイン（ニュージーランド・デリー・ボード製）1kgに水9kgを添加し、十分分散させ、10%水酸化ナトリウム水溶液を添加し、pHを7.0に調整し、カゼインを完全に溶解し、濃度約10%のカゼイン水溶液を調製した。該カゼイン水溶液を85℃で10分間加熱殺菌し、液温を50℃に調整し、吸着性樹脂（北越炭素社製。KS-35）に対して、該溶液をSV（空間速度）=2h<sup>-1</sup>の条件で吸着処理し、吸着性樹脂処理したカゼイン溶液を得た。

【0092】次いで、得られた吸着性樹脂処理カゼイン溶液（pH7.0）の温度を50℃に調整し、前記水酸化ナトリウムを添加してpHを9.5に調整し、ビオプレーゼsp-20（長瀬生化学工業社製）1,008,000活性単位（蛋白質1g当り1200活性単位）及びニュートラーゼ（ノボ・ノルディスク社製）1,344,000単位（蛋白質1g当り1,600活性単位）を添加し、50℃に保持して加水分解し、酵素反応を分解率によりモニターし、分解率が23.1%に達した時点で、85℃で10分間加熱して酵素を失活させ、酵素反応を停止し、10℃に冷却した。

【0093】この分解液を、濾過助剤としてスタンダードスーパーセル（セライト社製）により濾過し、次いで得られた濾過液の温度を10℃に調整し、吸着性樹脂

（北越炭素社製。KS-35）に対して、該濾過液をSV=10h<sup>-1</sup>の条件で吸着処理し、得られたカゼイン加水分解物を含有する溶液を常法により濃縮し、噴霧乾燥し、粉末状のカゼイン加水分解物約0.86kgを得た。

【0094】得られたカゼイン加水分解物を前記試験方法により試験した結果は、図1に示すとおりである（図1については前記のとおりである。）。これらの結果から、カゼイン加水分解物は、分解率23.1%、分子量1000ダルトン以下の画分が83.0%、3500ダルトン以上の画分が0.2%、アミノ酸遊離率5.1%、アミノ酸スコア100、透過率99.3%であった。

【0095】また、前記前記試験方法により試験した該カゼイン加水分解物は、保存安定性において、沈殿が生成せず、着色度が0.222と低く、ほぼ無味無臭であった。

【0096】実施例2

市販カゼイン（メルク社製。ハマーシュタインカゼイン）1.2kgに水8.8kgを添加し、十分分散させ、10%水酸化ナトリウム水溶液を添加し、pHを7.0に調整し、カゼインを完全に溶解し、濃度約12%のカゼイン水溶液を調製した。該カゼイン水溶液を85℃で10分間加熱殺菌し、液温を50℃に調整し、吸着性樹脂（オルガノ社製。XAD-7）に対して、該溶液をSV=2.5h<sup>-1</sup>の条件で吸着処理し、吸着性樹脂処理したカゼイン溶液を得た。

【0097】次いで、得られた吸着性樹脂処理カゼイン

溶液(pH7.0)の液温を50℃に調整し、前記水酸化ナトリウムを添加してpHを8.5に調整し、ブロメライン(天野製薬社製)1,224,000活性単位(蛋白質1g当り1200活性単位)、アルカラーゼ(ノボ・ノルディスク社製)5,100,000活性単位(蛋白質1g当り5000活性単位)、トリプシン(アリ社製)2,040,000活性単位(蛋白質1g当り2,000活性単位)を添加し、50℃に保持して加水分解し、酵素反応を分解率によりモニターし、分解率が25.7%に達した時点で、120℃で3秒間加熱して酵素を失活させ、酵素反応を停止し、10℃に冷却した。

【0098】この分解液をマイクロザEMP-313(旭化成社製。孔径0.25 $\mu$ m)を用い、膜分離法(マイクロフィルトレーション)により不溶物を濾過し、次いで得られた濾過液の液温を10℃に調整し、吸着性樹脂(オルガノ社製。XAD-7)に対して、該濾過液をSV=8h<sup>-1</sup>の条件で吸着処理し、得られた処理溶液を常法により濃縮し、噴霧乾燥し、粉末状のカゼイン加水分解物約1.03kgを得た。

【0099】得られたカゼイン加水分解物を前記試験方法により試験した結果、分解率25.7%、分子量1000ダルトン以下の画分が84.3%、3500ダルトン以上の画分が0.1%、アミノ酸遊離率6.1%、アミノ酸スコア100、透過率99.4%であった。

【0100】また、前記前記試験方法により試験した該カゼイン加水分解物は、保存安定性において、沈殿が生成せず、着色度が0.220と低く、ほぼ無味無臭であった。

#### 【0101】実施例3

カゼインナトリウム(ニュージーランド・デ일리・ボード製。アラネート)1.4kgを水12.6kgに溶解し、濃度約10%のカゼイン水溶液を調製した。該カゼイン水溶液を85℃で10分間加熱殺菌し、液温を50℃に調整し、吸着性樹脂(ダウケミカル社製。ダウエックスS-112)に対して、該溶液をSV(空間速度)=1.5h<sup>-1</sup>の条件で吸着処理し、吸着性樹脂処理したカゼイン溶液を得た。

【0102】これとは別に、プロテアーゼN(天野製薬社製)2,380,000活性単位(蛋白質1g当り2,000活性単位)、及びスミチームLP(新日本化学工業社製)5,355,000活性単位(蛋白質1g当り4,500活性単位)からなる蛋白質分解酵素混合物を4℃の冷水に分散して溶解し、酵素蛋白質の濃度として約10%の蛋白質分解酵素溶液を調製した。該蛋白質分解酵素溶液を、吸着性樹脂(ダウケミカル社製。ダウエックスS-112)に対して、該溶液をSV=2.0h<sup>-1</sup>の条件で吸着処理し、吸着性樹脂処理した蛋白質分解酵素溶液を得た。

【0103】次いで、得られた吸着性樹脂処理したカゼ

イン溶液の液温を50℃に調整し、前記水酸化ナトリウムを添加してpHを9.2に調整し、前記吸着性樹脂処理した蛋白質分解酵素溶液を添加し、50℃に保持して加水分解し、経時的に分解率をモニターし、分解率が26.1%に達した時点で、120℃で3秒間加熱して酵素を失活させ、酵素反応を停止し、10℃に冷却した。

【0104】この分解液をSEP-3013(旭化成社製。分画分子量3000)を用いた膜分離法(ウルトラフィルトレーション)により不溶物を濾過し、得られた濾過液の液温を10℃に調整し、吸着性樹脂(ダウケミカル社製。ダウエックスS-112)に対して、該濾過液をSV=12h<sup>-1</sup>の条件で吸着処理し、得られたカゼイン加水分解物を含有する溶液を常法により濃縮し、噴霧乾燥し、粉末状のカゼイン加水分解物約1.09kgを得た。

【0105】得られたカゼイン加水分解物を前記試験方法により試験した結果、分解率26.1%、分子量1000ダルトン以下の画分が85.1%、3500ダルトン以上の画分が0.1%、アミノ酸遊離率6.3%、アミノ酸スコア100、透過率99.7%であった。

【0106】また、前記前記試験方法により試験した該カゼイン加水分解物は、保存安定性において沈殿が生成せず、着色度が0.185と低く、ほぼ無味無臭であった。

#### 【0107】

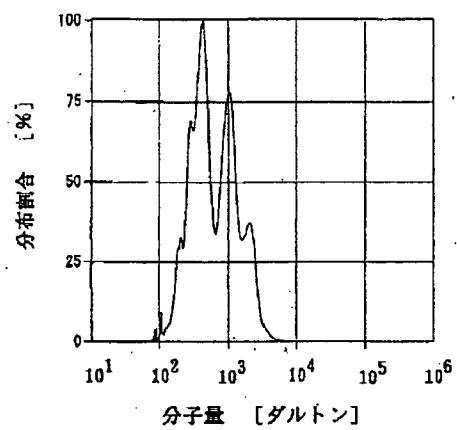
【発明の効果】以上詳記したとおり、本発明は、ほぼ無味無臭で低分子量、アミノ酸スコア100、かつ酸性溶液状態での保存安定性に優れているという良好な性質を有する新規なカゼイン加水分解物及びその製造方法に関するものであり、本発明により奏せられる効果は次のとおりである。

- 1) 本発明のカゼイン加水分解物は、ほぼ無味無臭であるので、一般食品、栄養食品等の食品用及び医療用の蛋白質供給素材として使用できる。
- 2) 本発明のカゼイン加水分解物は、低分子量で消化吸収性に優れているので、消化吸収能の未熟な乳幼児又は消化吸収能が低下している高齢者、病人への蛋白質供給素材として使用できる。
- 3) 本発明のカゼイン加水分解物は、溶液状態での保存安定性に優れているので、酸性飲料等の蛋白質素材として使用できる。
- 4) 本発明のカゼイン加水分解物は、アミノ酸スコアに優れているので、スポーツ選手向け食品等の蛋白質素材として使用できる。
- 5) 本発明の方法により、広範な用途を有するカゼイン加水分解物を製造することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明のカゼイン加水分解物の分子量分布を示す。

【図1】



## Machine translation JP11243866

---

- (19) **Publication country** Japan Patent Office (JP)  
(12) **Kind of official gazette** Open patent official report (A)  
(11) **Publication No.** JP,11-243866,A  
(43) **Date of Publication** September 14, Heisei 11 (1999)  
(54) **Title of the Invention** Casein hydrolysate and its manufacturing method  
(51) **International Patent Classification (6th Edition)**

A23J 3/34

3/10

A23L 1/305

C12P 21/06

### **FI**

A23J 3/34

3/10

A23L 1/305

C12P 21/06

**Request for Examination** Un-asking.

**The number of claims** 3

**Mode of Application** FD

**Number of Pages** 13

(21) **Application number** Japanese Patent Application No. 10-71371

(22) **Filing date** March 5, Heisei 10 (1998)

(71) **Applicant**

**Identification Number** 000006127

**Name** Morinaga Milk Industry Co., Ltd.

**Address** 5-33-1, Shiba, Minato-ku, Tokyo

(72) **Inventor(s)**

**Name** \*\*\*\*\* Hiroki

**Address** 5-1-83, Higashihara, Zama-shi, Kanagawa-ken Inside of the Morinaga Milk Industry Co., Ltd. nutrition science laboratory

(72) **Inventor(s)**

**Name** Miyagawa \*\*

**Address** 5-1-83, Higashihara, Zama-shi, Kanagawa-ken Inside of the Morinaga Milk Industry Co., Ltd. nutrition science laboratory

(72) **Inventor(s)**

**Name** Ochi \*\*

**Address** 5-1-83, Higashihara, Zama-shi, Kanagawa-ken Inside of the Morinaga Milk Industry Co., Ltd. nutrition science laboratory

(74) **Attorney**

**Name** Kudo Force

---

(57) **Abstract** (Modified)

**Technical problem** With low molecular weight, at the rate of low amino acid isolation, it excels in digestion nature, and it has an amino acid score 100, and it is \*\* \*\* tasteless no odor, and the casein decomposition product possessing the property excellent in the so-called preservation stability which does not produce turbidity, precipitate, condensation, browning, etc. in the mothball in a solution condition, and its manufacturing method are offered **it is transparent in the state of a solution, and** .

**Means for Solution** After contacting adsorbent resin to casein, carrying out **smell / the taste and** adsorption treatment and hydrolyzing the obtained resin treatment casein with a proteolytic enzyme, insoluble matter is carried out a \*\* exception, the filtrate is contacted to adsorbent resin, adsorption treatment of bitter peptides, the turbidity factor, etc. is carried out, and a tasteless odorless decomposition product is acquired. The ratio of a fraction with a molecular weight of 1000dalton or less is 75 % of the weight or more, and it is suitable for this decomposition product that the ratio of a fraction 3500dalton or more considers as less than 1 % of the weight.

---

#### **Claim(s)**

**Claim 1** The ratio of a fraction with a being **following a-g, and the cracking severity of a casein / 17 - 30%** b molecular weight of 1000dalton or less is more than 75% (weight). The ratio of a fraction with a molecular weight of 3500dalton or more And 1% It is the following. (Weight) c) 10% of being **being / the amino acid score of being / the percentage of the mass sum total of the free amino acid occupied to the mass sum total of all the amino acid contained in casein hydrolysate / under 10% (weight) / d casein hydrolysate / 100 / e flavor / tasteless no odor** f casein hydrolysate A water solution is heat-treated for 10 minutes at 100 degrees C in being **the permeability measured on the wavelength of 540nm using the glass cell with a thickness / of a cel / of 1cm / 99% or more** gpH4. (Weight) Casein hydrolysate which has the physicochemical property of the absorbance which there is no precipitate generation after preservation for two months, and was measured on the wavelength of 420nm using the glass cell with a thickness **of a cel** of 1cm being 0.250 or less.

**Claim 2** The manufacturing method of the casein hydrolysate characterized by processing casein with adsorbent resin, and adding a proteolytic enzyme to this processing casein, understanding by the enzyme, suspending an enzyme reaction, and filtration removing insoluble matter, and processing the obtained filtrate by adsorbent resin.

**Claim 3** The manufacture approach of casein hydrolysate according to claim 2 that a proteolytic enzyme is beforehand processed by adsorbent resin.

---

#### **Detailed Description of the Invention**

##### **0001**

**Field of the Invention** This invention is low molecular weight, it is tasteless no odor mostly, its free amino acid content is low, and an amino acid score is excellent with 100, and since it is transparent in the state of a solution, it relates to extensively applicable new casein hydrolysate and its efficient manufacture approach as protein materials, such as a drink, protective foods, and various general food.

**0002** The cracking severity of this invention of casein is 17 - 30% in detail, The ratio of a fraction with a molecular weight of 1000dalton or less is more than 75% (weight), and the ratio of a fraction with a molecular weight of 3500dalton or more is under 1% (weight), The percentage of the mass sum total of the free amino acid occupied to the mass sum total of all the amino acid contained in casein hydrolysate is under 10% (weight), Flavor is **that the amino acid score of casein hydrolysate is 100**, tasteless no odor, The permeability which measured 10% (weight) water solution of casein hydrolysate on the wavelength of 540nm using the glass cell with a thickness **of a cel** of 1cm is 99% or more, And the absorbance which it heat-treats for 10 minutes at 100 degrees C in pH4, and there is no



precipitate generation after preservation for two months, and was measured on the wavelength of 420nm using the glass cell with a thickness of a cell of 1cm is 0.250 or less, It is related with the manufacturing method at the casein hydrolysate and the list which have \*\*\*\*\*.

**0003** In this specification, a percentage is the display by weight, as long as there is no notice especially except for permeability. Moreover, in this specification, the rate of amino acid isolation means the percentage of the sum total mass of the free amino acid to the sum total mass of casein hydrolysate (dry matter), i.e., the mixture of a peptide and a free amino acid, and all inner amino acid.

**0004**

**Description of the Prior Art** The mixture of the peptide and free amino acid which are obtained by hydrolyzing protein Since there is various predominance as compared with independent protein, amino acid mixture, etc., it is observed from every direction. Nutritionally The hydrolyzate of that a dipeptide and tripeptide are absorbed in a path different from amino acid more quickly than the mixture of the configuration amino acid and protein It is clear that there is no fluctuation in the absorbed amount of each amino acid compared with the configuration amino acid mixture etc. **a metabolic turnover, the 27th volume, the 993-1000th page, and 1990.**

**0005** Moreover, the protein contained for food is a foreign protein for a man, when absorbed by the inside of the body, having antigenic in the condition with inadequate digestion, an allergy symptom is presented, and the case which causes the risk of a life depending on the case also exists. The protein in food is hydrolyzed with an enzyme as this one solution, decreasing or vanishing antigenic is performed, and the food which blended this proteolysis object is also increasing **JP,4-248959,A; Japanese journal OBU daily - and - hood Science (Japanese Journal of Dairy and Food Science), the 33rd volume, the A-5th to A-12 pages, and 1984.**

**0006** As above, it is known that low-molecular-weight peptides, such as a dipeptide and tripeptide, are very effective from the field of digestion nature and nutrition physiology, and the low-molecular-weight peptide constituent which made a dipeptide and tripeptide the subject is widely called for as a protein material.

**0007** Recently, many drinks soft drink type , **such as a sport drink which blended the low-molecular-weight peptide constituent, and a recovery-from-fatigue drink,** are developed. These soft drink types of drink is adjusted to the acid range of pH4 order extent, and it is heat-sterilized by the approach of a hot pack, a retort, etc., fills up, and becomes a product, and the circulation period after restoration is usually two months - an one-year about room in normal temperature marketing. In order to give visual coolness, needless to say immediately after heat sterilization, turbidity, precipitate, condensation, browning, etc. tended to generate the conventional product during this circulation period, and these drinks had the problem which is transparence or a translucent liquid of reducing product value remarkably, although the thing demand was carried out.

**0008** Furthermore, effectiveness to the athletic ability of various amino acid and a peptide is clarified by development of sports nutrition study, and the low-molecular-weight peptide constituent blended with the supplement for sport players etc. was also called on to be an amino acid score 100 recently.

**0009** It was the big problem on which an unpleasant smell and the unpleasant taste occur and this bars extensive use of proteolysis on the other hand with the material smell originating in raw material protein, the material taste, the various taste peptides produced by hydrolysis when protein is hydrolyzed with a conventional method using an enzyme etc. and proteolysis is manufactured in order to obtain a low-molecular-weight peptide constituent.

**0010** Although some casein hydrolysate by which flavor has been improved is

developed conventionally, it will be as follows if these are illustrated.

(1) The casein hydrolysate with good flavor by which the material smell was reduced is indicated by processing casein with any one or such mixture of a lactic-acid-bacteria origin protease, lactic acid bacteria, and lactic-acid-bacteria debris (JP,7-303455,A.). Hereafter, it is indicated as the conventional technique 1. .

(2) Cracking severity and molecular weight distribution are specified and the casein hydrolysate with good flavor by which antigenic was reduced is indicated (JP,8-228692,A.). Hereafter, it is indicated as the conventional technique 2. .

(3) The solution is transparent, it excels in preservation stability, and the tasteless odorless casein hydrolysate whose tryptophan contained in 1g of casein hydrolysate is 4mg or less is indicated (JP,9-28306,A.). Hereafter, it is indicated as the conventional technique 3. .

(4) Casein hydrolysate without bitterness and antigenic is indicated (JP,54-36235,B.). Hereafter, it is indicated as the conventional technique 4. .

(5) A low allergenic casein peptide constituent with little bitterness and the unpleasant taste and its manufacture approach are indicated (JP,6-113893,A.). Hereafter, it is indicated as the conventional technique 5. .

**0011** However, although it could be satisfied about flavor, since the content of the low-molecular-weight peptide which was excellent in digestion since cracking severity was low not only hardly contains the casein hydrolysate which decomposed casein slightly like said conventional technique 1, but it did not have the solution thermal stability in low pH region, it had the fault that it could not be used to an acid drink with need increasing recently.

**0012** Moreover, although antigenic was low as for the casein hydrolysate of said conventional technique 2, flavor was good and digestion nature was excellent in the good point, since it was not tasteless no odor, the application range was limited and there were problems, such as turbidity produced during the circulation period after heat-treatment, precipitate, condensation, and browning.

**0013** Although said conventional technique 3 of the solution was transparent, was tasteless no odor and was casein hydrolysate which has also solved the problem of the preservation stability after heat-treatment, in order to carry out resin treatment of the flavor after hydrolysis until it becomes tasteless no odor, the tryptophan contained in 1g of casein hydrolysate was set to 4mg or less, and it had the problem that an amino acid score 100 was not filled.

**0014** Processing which applied adsorbents, such as activated carbon widely used for processing of deodorization, decolorization, debitterness, etc. by food stuff industry, the chemical industry, etc. from the former for the flavor improvement of the protein hydrolysate in said conventional technique 3, to protein hydrolysate is performed. However, in order that this processing may be contacted to an adsorbent and may improve flavor, without completely removing the material taste and material smell originating in raw material protein after hydrolyzing, it must contact hydrolysis liquid adsorbents and for a long time **a lot of** . Therefore, the peptide containing the amino acid which compatibility with an adsorbent is high and is especially easy to adsorb not only causes the recovery fall of the protein hydrolysate which it adsorbs too much, and the unpleasant taste, an unpleasant odor, and not only a color but a certain kind of amino acid, a useful peptide, etc. are removed by the part, consequently is manufactured, but had caused nutritional and functional loss by loss of the peptide which is a useful component.

**0015** Moreover, since the tryptophan which is an essential amino acid was easy to adsorb with a hydrophobic adsorbent, the problem that the protein hydrolysate after adsorbent processing did not fill an amino acid score 100 often generated it.

**0016** Moreover, while reducing antigenic, in order to reduce bitterness in said conventional technique 4, it was indicating the approach of manufacturing the casein

hydrolysate hydrolyzed to altitude to 40% of isolation amino acidity, but since the free amino acid was generating in large quantities, in use to a soft drink, it not only has completely unsuitable flavor by the taste, but it had produced the fault that browning by heating was remarkable.

**0017** Furthermore, in said conventional technique 5, although the low allergen-ized casein peptide which introduces a "bitterness unit", and screens the combination of a proteolytic enzyme by making this into an index, and allergenic decreases, and does not have bitterness and an unpleasant taste was indicated, the isolation amino acidity is 30 - 55%, and a high price, and had the same trouble as said conventional technique 4.

**0018** It was very difficult to improve the flavor of the low-molecular-weight peptide which uses casein as a raw material, to solve problems, such as turbidity during a retention period, precipitate, condensation, and browning, and to secure an amino acid score 100 in spite of various examination the passage clear from these conventional techniques.

**0019**

**Problem(s) to be Solved by the Invention** In said conventional technique, although flavor is satisfying The casein hydrolysate which cracking severity is low and leaves a problem to the solution thermal stability in a low pH region, The casein hydrolysate which is not tasteless no odor in low antigenic one although flavor is good, The casein hydrolysate which does not fill an amino acid score 100 although preservation stability is also excellent in tasteless no odor, The casein hydrolysate to which a problem has a free amino acid content in taste highly although there are not bitterness and antigenic, It is **that the low allergenic casein peptide constituent with which a problem has a free amino acid content in taste highly is only indicated although there are little bitterness and unpleasant taste, and** . It is tasteless no odor, excelled in the preservation stability after heat sterilization, and was not conventionally known about the casein hydrolysate which fills an amino acid score 100.

**0020** Furthermore, the former and cracking severity are 17 - 30%, and the ratio of a fraction with a molecular weight of 1000dalton or less is more than 75% (weight). And the ratio of a fraction with a molecular weight of 3500dalton or more is under 1% (weight). The rate of amino acid isolation is under 10% (weight), and an amino acid score is 100. The casein hydrolysate which has the digestion nature which was tasteless no odor, is transparent, was excellent in the so-called preservation stability which precipitate etc. does not produce in the mothball in a solution condition, and was excellent in the shape of a solution was not known.

**0021** Therefore, using the casein which has the outstanding nutritive value as a raw material, it is transparent, excels in preservation stability, and has an amino acid score 100, and various food, such as a drink saved in the state of a solution, looked forward to the broadly applicable casein hydrolysate which also combined flavor and digestion nature and has been improved.

**0022** this invention persons by removing beforehand a material smell, a material taste, etc. originating in raw material protein, as a result of repeating research wholeheartedly for the purpose of developing the new product which can solve said various troubles which the conventional product has in view of said conventional technique Even if it was the case where contact to the proteolysis liquid after a hydrolysis reaction and adsorbent resin was controlled more slightly than a conventional method, the fact that good flavor and preservation stability were acquired was found out.

**0023** Namely, by this invention persons' processing casein by adsorption resin, and hydrolyzing this processed casein with an enzyme, filtering insoluble matter and processing filtrate by adsorption resin from hydrolyzate The casein hydrolysate which

has the specific physicochemical property obtained as quality of an effluent is transparent in the state of the solution which could not be accomplished in conventional casein hydrolysate. It excelled in preservation stability and had the amino acid score 100, and it is tasteless no odor, and providing the good property of excelling in digestion nature, and the method of being stabilized and manufacturing this casein hydrolysate were found out, and this invention was completed.

**0024** The purpose of this invention is low molecular weight, is excellent in digestion nature, is a rate of low amino acid isolation, has an amino acid score 100, is tasteless no odor mostly, and is transparent in the state of a solution, and is offering the casein hydrolysate possessing the property excellent in the so-called preservation stability which does not produce turbidity, precipitate, condensation, browning, etc. in the mothball in a solution condition.

**0025** Moreover, it is low molecular weight, excels in digestion nature, is a rate of low amino acid isolation, and has an amino acid score 100, and flavor is almost tasteless no odor, and other purposes of this invention have it in the state of a solution, and are offering the manufacture approach of casein hydrolysate which turbidity, precipitate, condensation, browning, etc. do not produce in the mothball in a solution condition of having provided the property excellent in the so-called preservation stability. **transparent**

**0026**

**Means for Solving the Problem** The ratio of a fraction with a being **following a-g, and the cracking severity of a casein / 17 - 30%** b molecular weight of 1000dalton or less of invention of the first of this invention which solves said technical problem is more than 75% (weight). The ratio of a fraction with a molecular weight of 3500dalton or more And 1% It is the following. (Weight) c) 10% of being **being / the amino acid score of being / the percentage of the mass sum total of the free amino acid occupied to the mass sum total of all the amino acid contained in casein hydrolysate / under 10% (weight) / d casein hydrolysate / 100 / e flavor / tasteless no odor** f casein hydrolysate A water solution is heat-treated for 10 minutes at 100 degrees C in being **the permeability measured on the wavelength of 540nm using the glass cell with a thickness / of a cel / of 1cm / 99% or more** gpH4. (Weight) It is casein hydrolysate which has the physicochemical property of the absorbance which there is no precipitate generation after preservation for two months, and was measured on the wavelength of 420nm using the glass cell with a thickness **of a cel** of 1cm being 0.250 or less.

**0027** Invention of the second of this invention which solves said technical problem is the manufacturing method of the casein hydrolysate characterized by processing casein with adsorbent resin, and adding a proteolytic enzyme to this processing casein, understanding by the enzyme, suspending an enzyme reaction, and filtration removing insoluble matter, and processing the obtained filtrate by adsorbent resin, and requires also as a desirable mode that a proteolytic enzyme is beforehand processed by adsorbent resin.

**0028**

**Embodiment of the Invention** Next, although a full account is given about this invention, in order to make an understanding of this invention easy, it explains from invention of the second of this invention, i.e., the manufacture approach of casein hydrolysate, (it is hereafter written as the approach of this invention.) first.

**0029** The casein of the start raw material used for the approach of this invention is the mixture of caseinate, such as acid casein, such as lactic acid casein separated from a commercial item or cow's milk, a skim milk, etc. by the well-known approach, and hydrochloric-acid casein, sodium caseinate, potassium caseinate, and calcium caseinate, or such arbitration.

**0030** This raw material casein is distributed to water or warm water, and it dissolves. Although the limit according to rank does not have the concentration of this solution, it is desirable from the point of efficiency and operability to usually make it the density range around 5 - 15% by protein conversion.

**0031** It is desirable from the point of the deterioration prevention by saprophytic-bacteria contamination to carry out grade heat sterilization of said casein solution for 10 minutes at 80-85 degrees C. Subsequently, said sterilized casein solution is processed by adsorbent resin.

**0032** As adsorbent resin used for the approach of this invention, commercial items, such as Dowex S-112 (Dow Chemical Co. make), XAD-7 (ORGANO CORP. make), and KS-35 (Hokuetsu carbon company make), can be illustrated.

**0033** Processing with the adsorbent resin of the casein in the approach of this invention The batch type which adsorbent resin is fed **batch type** into a casein solution and carries out predetermined time contact, Are possible in any method of the column type which dips a casein solution to the column filled up with adsorbent resin. In a batch type In order to carry out adsorption treatment of the taste and the stinking thing component, sufficient adsorbent resin of an amount is added in said casein solution in consideration of the adsorption capacity, and filtration etc. separates the adsorbent resin after adsorption treatment into it.

**0034** Moreover, by the column formula, in consideration of the adsorption capacity, said casein solution can be dipped in the column filled up with adsorbent resin by sufficient rate of flow, in order to carry out adsorption treatment of the taste and the stinking thing component, and it can carry out by collecting the casein solutions after adsorption treatment. It is a batch type, and when KS-35 (Hokuetsu carbon company make) is used as adsorbent resin, specifically, adsorption treatment of the taste and the stinking thing component can be carried out by using more than the adsorbent resin 0.3 weight section to the casein (85% of protein contents) 1 weight section.

**0035** Subsequently, if there is need, pH of the casein solution processed by adsorbent resin can also be adjusted near the optimal pH of the proteolytic enzyme to be used using alkali or an acid solution. As an alkali solution for this pH adjustment, a sodium hydroxide, a potassium hydroxide, potassium carbonate, etc. can be illustrated, and a hydrochloric acid, a citric acid, a sulfuric acid, an acetic acid, a malic acid, a gluconic acid, etc. can be illustrated as an acid solution, respectively.

**0036** A proteolytic enzyme is distributed in 4-10-degree C cold water, and it dissolves. Although the limit according to rank does not have the concentration of this solution, it is desirable from the point of efficiency and operability to usually consider as about 3 - 10% of enzyme concentration.

**0037** the proteolytic enzyme used by the approach of this invention -- endoprotease -- it is -- one kind -- or two or more kinds can be used, combining.

**0038** As a proteolytic enzyme used by this invention, the endoproteases of the animal origins (for example, a trypsin, a chymotrypsin, a pepsin, etc.), the vegetable origins (for example, a papain, bromelain, ficin, etc.), and the microorganism origins (for example, lactic acid bacteria, yeast, mold, a Bacillus subtilis, an Actinomyces, etc.) and these rough purification objects, fungus body debris, etc. can be illustrated. As a commercial item of these enzymes, BIOPURAZE (the Nagase Seikagaku make), Proteases N (the Amano Pharmaceuticals company make) and PTN (Novo Nordisk make), a pepsin (made in BORUFU gang Mule Bauer), a papain (ant company make), etc. can be illustrated.

**0039** In the approach of this invention, the proteolytic enzyme to be used can also be processed by adsorbent resin. As adsorbent resin used for the approach of this invention, commercial items, such as Dowex S-112 (Dow Chemical Co. make), XAD-7 (ORGANO CORP. make), and KS-35 (Hokuetsu carbon company make), can be

illustrated.

**0040** Processing with the adsorbent resin of the proteolytic enzyme in the approach of this invention is possible in any method of the batch type which adsorbent resin is fed **batch type** into a proteolytic enzyme solution, and carries out predetermined time contact, and the column type which dips a proteolytic enzyme solution to the column filled up with adsorbent resin.

**0041** In a batch type, in order to carry out adsorption treatment of the taste and the stinking thing component, sufficient adsorbent resin of an amount is added in said proteolytic enzyme solution in consideration of the adsorption capacity, and filtration etc. separates the adsorbent resin after adsorption treatment into it. Moreover, by the column formula, in consideration of the adsorption capacity, said proteolytic enzyme solution can be dipped in the column filled up with adsorbent resin by sufficient rate of flow, in order to carry out adsorption treatment of the taste and the stinking thing component, and it can carry out by collecting the proteolytic enzyme solutions after adsorption treatment.

**0042** When KS-35 (Hokuetsu carbon company make) is used as adsorbent resin in the case of a batch type, specifically, adsorption treatment of the taste and the stinking thing component can be carried out by using more than the adsorbent resin 0.2 weight section to the proteolytic enzyme (40% of protein contents) 1 weight section.

**0043** Subsequently, the proteolytic enzyme solution processed by the proteolytic enzyme solution or said adsorbent resin in the casein solution processed by said adsorbent resin is added. when adding two or more kinds of proteolytic enzymes, desired cracking severity and molecular weight distribution can be attained to casein hydrolysate -- if it becomes -- package addition -- or it can divide a little and can also add serially.

**0044** although the amount of the enzyme used to said start raw material changes with substrate concentration, an enzyme potency, reaction temperature, and reaction time -- general -- per **1000** 1g of protein in a start raw material - 10000 activity units -- comparatively -- coming out -- an enzyme -- independence -- or two or more sets are seen and it adds.

**0045** The limit according to rank does not have the temperature of an enzyme reaction, it is chosen from the range with which practical use including the optimum-temperature range which an enzyme operation discovers may be presented, and it is usually chosen out of the range of 30-70 degrees C. The putrefaction under enzyme reaction can be prevented by maintaining temperature in the range of 50-60 degrees C.

**0046** Since the decomposition product which has a different physicochemical property for every manufacture batch may arise if advance conditions differ and reaction duration of an enzyme reaction is set constant by reaction conditions, such as a class of use enzyme and combination, reaction temperature, and Initiation pH, the hydrolysis reaction time of the casein hydrolysate of this invention cannot generally be determined. Therefore, it is necessary to act as the monitor of the enzyme reaction and to determine reaction duration.

**0047** Extent of hydrolysis removes the insoluble matter generated with hydrolysis by filtration, the casein hydrolysate contained in filtrate is **the ratio of a fraction with a molecular weight of 1000dalton or less** 75% or more, and the ratio of a fraction with a molecular weight of 3500dalton or more is less than 1%, and cracking severity is 17 - 30%, and the rate of amino acid isolation sets up reaction conditions, such as reaction temperature, reaction time, and an enzyme addition, in less than 10% of range.

**0048** A halt of an enzyme reaction is performed by deactivation of the enzyme in decomposition liquid, or removal, and it can carry out by removal of the enzyme

from the decomposition liquid using the heating deactivation processing by the conventional method, ultrafiltration membrane, etc. Although whenever **stoving temperature / of heating deactivation processing**, and the holding time can set up the conditions which can fully deactivate in consideration of the thermal stability of the used enzyme, they can be performed with the retention temperature for **for / 30 minutes** / - 2 seconds in a 80-130-degree C temperature requirement, for example.

**0049** Decomposition liquid is cooled with a conventional method after deactivation of the enzyme in decomposition liquid, and the insoluble matter generated at the time of the hydrolysis reaction which exists in the solution notes after said casein hydrolysis reaction termination by filtration, and/or enzyme heating deactivation is removed. The approach of filtration can illustrate for example, diatomaceous earth filtration, precision filtration, an ultrafiltration, etc.

**0050** Subsequently, contact processing of the filtrate from which said insoluble matter was removed is carried out with adsorbent resin, resin is separated, and it excels in preservation stability, and it is tasteless no odor, and is an amino acid score 100, and the casein hydrolysate of this invention excellent in digestion nature can be obtained in the state of a solution. Since the factor to which turbidity, precipitate, condensation, browning, etc. are caused during a retention period besides taste peptides, such as bitter peptides produced by hydrolysis, remains a little in filtrate, this contact down stream processing removes these.

**0051** Any method of the batch type which adsorbent resin is fed **batch type** into the filtrate from which said insoluble matter was removed, and carries out predetermined time contact, and the column type which dips the filtrate from which said insoluble matter was removed to the column filled up with adsorbent resin can perform processing with the adsorbent resin of the filtrate from which said insoluble matter in the approach of this invention was removed.

**0052** In a batch type, securing the amino acid score 100, in order to reduce the factor in which the taste peptide which makes bitter peptides the start and turbidity, precipitate, condensation, browning, etc. are caused to the specified quantity, sufficient adsorbent resin of an amount is added to the filtrate from which said insoluble matter was removed in consideration of the adsorption capacity, and filtration etc. separates the adsorbent resin after adsorption treatment into it.

**0053** Moreover, securing the amino acid score 100 to the column which filled up adsorbent resin with the column type in consideration of the adsorption capacity for the filtrate from which said insoluble matter was removed, in order to reduce the factor in which taste peptides, such as bitter peptides, and turbidity, precipitate, condensation, browning, etc. are caused to the specified quantity, it can dip by sufficient rate of flow, and can carry out by collecting the proteolytic enzyme solutions after adsorption treatment.

**0054** In the case of a column type, KS-35 (Hokuetsu carbon company make) is specifically used as adsorbent resin. By dipping 10% solution of concentration of casein hydrolysate (88% of protein contents) in the column filled up with adsorbent resin by the rate of flow beyond  $SV=10h^{-1}$  The factor in which the taste peptide which makes bitter peptides the start and turbidity, precipitate, condensation, browning, etc. are caused can be reduced to the specified quantity, securing the amino acid score 100.

**0055** In the case of a batch type, contact to adsorbent resin can perform. As adsorbent resin, commercial items, such as Dowex S-112 (Dow Chemical Co. make), XAD-7 (ORGANO CORP. make), and KS-35 (Hokuetsu carbon company make), can be illustrated.

**0056** The solution containing the obtained casein hydrolysate is possible also for using it as it is, and this concentration liquid can also be further used for it if needed,

using it as the concentration liquid which condensed this solution by the well-known approach, and the powder dried by the well-known approach.

**0057** Next, invention of the first of this invention is indicated. The casein hydrolysate obtained by invention of the second of this invention as aforementioned has the following physicochemical property of a-g the passage clear from the example which carries out a postscript.

**0058** a) The cracking severity of casein is 17 - 30%.

b) The ratio of a fraction with a molecular weight of 1000dalton or less is 75% or more, and the ratio of a fraction with a molecular weight of 3500dalton or more is less than 1% as shown in drawing 1 . Drawing 1 shows the molecular weight distribution of the casein hydrolysate of this invention obtained according to the example 1, and an axis of ordinate and an axis of abscissa show a distribution rate and molecular weight, respectively.

c) The percentage of the sum total mass of the free amino acid occupied in the sum total mass of all the amino acid contained in casein hydrolysate is under 10% (weight).

d) The amino acid score of casein hydrolysate is 100.

e) Flavor is tasteless no odor.

f) The permeability which measured 10% (weight) water solution of casein hydrolysate on the wavelength of 540nm using the glass cell with a thickness of a cel of 1cm is 99% or more.

g) When it heat-treats for 10 minutes at 100 degrees C in pH4, the absorbance which there is no precipitate generation after preservation for two months, and was measured on the wavelength of 420nm using the glass cell with a thickness of a cel of 1cm is 0.250 or less.

**0059** As shown in said a-g the casein hydrolysate of this invention When the peptide which exceeds the molecular weight of 1000dalton according to specific cracking severity is reduced and the ratio of a fraction with a molecular weight of 3500dalton or more makes the ratio of a fraction with a molecular weight of 1000dalton or less less than 1% 75% or more Excel in digestion nature from an intestinal tract, control isolation of amino acid, and the rate of amino acid isolation is made into less than 10%. By contact to raw material casein and the adsorbent resin of casein hydrolysis filtrate, though flavor is tasteless no odor, an amino acid score 100 is held. By contact to the adsorbent resin of the casein hydrolysis filtrate after filtration processing, raw material casein and hydrolysis, and filtration, and insoluble matter and turbidity, It is casein hydrolysate which has the good property for it to be transparent in the state of a solution, and to excel in the preservation stability in the solution condition after heat sterilization by removing the factor in which precipitate, condensation, browning, etc. are caused.

**0060** The casein hydrolysate of this invention is excellent in digestion nature, flavor is tasteless no odor, and holds an amino acid score 100 and has the description it is featureless to the conventional casein hydrolysate of it being transparent in the state of a solution, and excelling in the so-called preservation stability which does not produce turbidity, precipitate, condensation, browning, etc. in the mothball in a solution condition.

**0061** Next, although the example of a trial was shown and this invention was explained to the detail, the following test method was adopted in this invention.

(1) The total nitrogen of a sample was measured with the measuring method Kjeldahl method of proteinic cracking severity, the formol voice nitrogen of a sample was measured by the formol titration method, respectively, and proteinic cracking severity was computed by the degree type from these values.

Cracking severity (%) =(formol voice nitrogen / total nitrogen) x100**0062** (2) It measured with the measuring method high speed liquid chromatography of



molecular weight distribution (the volumes for Nobuo Ui, "the high speed liquid chromatography of protein and a peptide", the chemistry special number title No. 102, the 241st page, a transformation-into-a-public-traded-company study member, 1984). Poly hide ROKISHI ethyl ASUPARUTAMIDO column **Poly Hydroxyethyl Aspartamide Column: The Pori El C (PolyLC) company make. It was eluted in a part for rate-of-dissolution/of 0.4ml with 20mM sodium chloride and 50mM formic acid using the diameter of 4.6mm, and die-length of 200mm .** In detection, data analysis used the GPC analysis system (Shimadzu Corp. make) using the UV detector (Shimadzu Corp. make).

**0063** (3) About amino acid other than the measuring method tryptophan of amino acid composition, a cysteine, and a methionine, 110 degrees C of samples are hydrolyzed with the hydrochloric acid of 6 conventions for 24 hours, 110 degrees C carries out alkali decomposition with a barium hydroxide about a tryptophan for 22 hours, 110 degrees C hydrolyzes with the hydrochloric acid of six conventions after performic-acid processing about a cysteine and a methionine for 18 hours, and it is an amino acid automatic analysis machine (Hitachi, Ltd. make.), respectively. 835 molds analyzed and the mass of amino acid was measured.

**0064** (4) Compute the mass of all the amino acid in a sample by measuring each amino acid composition in the calculation approach sample of the rate of amino acid isolation by the approach of the above (3), and totaling this. Subsequently, the mass of all the free amino acids in a sample is computed by carrying out deproteinization of the sample with a sulfosalicylic acid, measuring the mass of each free amino acid which remains by the approach of the above (3), and totaling this. From these values, the free amino acid content in a sample was computed by the degree type. The mass of each amino acid of the sample measured by the measuring method of the calculation approach aforementioned amino acid composition of rate (%) of amino acid isolation = (mass of mass / all amino acid of all free amino acids) x100 (5) amino acid score, the amount of total nitrogen of the sample for which it asked with the Kjeldahl method, and 1973 FAO/WHO amino acid score patterns (for general) (edited by the Resources Council, the Science and Technology Agency, and the National Institute of Resources --) "The revised Japan food amino-acid-composition table", the 211-217th page, the Printing Bureau issue, and Showa 61 were used, the rate (%) to the amino acid score pattern in 1973 was computed by the degree type for every amino acid, and it considered as the amino acid score with the minimum value in it. In addition, the amino acid score in case the minimum value exceeds 100 was set to 100 according to usually.

**0065** The amount (mg/gN) xof amino acid 100 concerned of each amino acid content (mg/gN) / score pattern in the rate (%) = sample to the score pattern in 1973.

**0066** (6) The panel which consists of 20 man and woman from 20 years old to 40 years old each, each sample in which each sample carried out flavor (taste) test preparation was sensuously examined by the following evaluation approach about the existence of taste, and its strength. each sample -- zero point: -- taste-less one point: -- taste -- weak two point: -- taste and \*\* -- strong three point: -- taste -- four steps of strong things -- evaluating -- the average of the evaluating point of each sample -- computing -- tasteless: -- taste:0.5 or more point 1.5 \*\*\*\* weak less than 0.5 points -- a little strong taste: -- it judged by 1.5 or more point the criteria below beyond taste:2.5 point 3.0 strong **less than 2.5** .

**0067** (7) The panel which consists of 20 man and woman from 20 years old to 40 years old each, each sample in which each sample carried out flavor (smell) test preparation was sensuously examined by the following evaluation approach about the stinking one existence and its strength. each sample -- zero point: -- smell-less one point: -- stinking -- weak two point: -- a little strong stinking three point: --

stinking -- four steps of strong things -- evaluating -- the average of the evaluating point of each sample -- computing -- no odor: -- weak less than 0.5 points -- stinking -- : -- 0.5 or more points are a little strong 1.5 \*\*\*\* -- stinking -- : -- strong **less than / 1.5 or more / 2.5** -- it stank and judged by the criteria below beyond :2.5 point 3.0.

**0068** (8) The measuring method casein hydrolysate sample of permeability was dissolved in water at 10% of solid content concentration, and the permeability was measured the wavelength of 540nm with U-spectrophotometer 3200 mold (Hitachi, Ltd. make) using the glass cell with a thickness **of a cel** of 1cm.

**0069** (9) with **citric-acid addition adjusts to pH4, it dissolves in water at 10% of solid content concentration, and a 250ml transperence glass bottle is filled up, at 100 degrees C, the sample of preservation stability (precipitate generation) test-method casein hydrolysate is heated for 10 minutes, and carries out water cooling, it saves for two months within 37-degree C humidistat, and macro-scopic observation of the generation of precipitate is carried out,** and those with precipitate (+), and no precipitate -- it displayed by (-).

**0070** (10) Citric-acid addition adjusts the sample of preservation stability (whenever **coloring**) trial casein hydrolysate to pH4. Dissolve in water at 10% of solid content concentration, and a 250ml transperence glass bottle is filled up. At 100 degrees C, it heated for 10 minutes, water cooling was carried out, it saved for two months within 37-degree C humidistat, and the absorbance was measured for the supernatant liquor of preservation liquid the wavelength of 420nm with U-spectrophotometer 3200 mold (Hitachi, Ltd. make) using the glass cell with a thickness **of a cel** of 1cm.

**0071** the example 1 of a trial -- comparison examination of this trial was carried out **casein hydrolysate / the casein hydrolysate of this invention, and / which was created with the conventional technique** about that cracking severity, the ratio of a fraction with a molecular weight of 1000dalton or less, the ratio of a fraction with a molecular weight of 3500dalton or more, the rate of amino acid isolation, an amino acid score, flavor (taste, smell), permeability, and preservation stability (whenever **precipitate generation and coloring**).

**0072** 1) preparation of a sample -- a total of five sorts of samples (sample numbers 1-5) of one sort of samples prepared by the approach of four sorts of samples prepared based on the publication of the following conventional technique and this invention were prepared.

Sample 1: This invention casein hydrolysate obtained in the example 1 of this invention.

Sample 2: Casein hydrolysate obtained by the specification of the conventional technique 1 according to the example 1 of a publication by decomposing casein by FC-H (Lactobacillus helveticus fungus body concentration freezing liquid).

Sample 3: Casein hydrolysate obtained by the specification of the conventional technique 2 according to the example 1 of a publication by decomposing casein by BIOPURAZE sp-20 (the Nagase Seikagaku make), Protease N (the Amano Pharmaceuticals company make), and PTN6.0S (Novo Nordisk make).

Sample 4: Casein hydrolysate which decomposed casein by BIOPURAZE sp-20 (the Nagase Seikagaku make), Protease N (the Amano Pharmaceuticals company make), and PTN6.0S (Novo Nordisk make), processed by Amberlite XAD-7 (ORGANO CORP. make) according to the example 1 given in the specification of the conventional technique 3, and was obtained.

Sample 5: Casein hydrolysate obtained by the specification of the conventional technique 4 according to the example 1 of a publication by decomposing casein by Lactobacillus helveticus (HANZEN marketing strain) powder debris, pancreatin (the Amano Pharmaceuticals company make), and protease A (the Amano

Pharmaceuticals company make).

**0073** 2) Each of the cracking severity of test-method each sample, the ratio of a fraction with a molecular weight of 1000dalton or less, the ratio of a fraction with a molecular weight of 3500dalton or more, the rate of amino acid isolation, an amino acid score, flavors (taste, smell), permeability, and preservation stability (whenever **precipitate generation and coloring** ) was measured with the aforementioned test method, and was examined.

**0074** 3) a trial result -- the result of this trial is as being shown in Table 1. It became clear that the casein hydrolysate having the good property in which are less than 1%, less than 10% of rates of amino acid isolation, an amino acid score 100, and tasteless no odor, and permeability is **ratio / of the fraction 17 - 30% and not more than molecular weight 1000 dalton / ratio / of a fraction with 75% / or more / and a molecular weight of 3500dalton or more** excellent in 99% or more and preservation stability in cracking severity was only casein hydrolysate of this invention the passage clear from Table 1.

**0075** In addition, although the class and manufacturing method of a start raw material were changed and examined, the almost same result was obtained.

**0076**

**Table 1**

**0077** the example 2 of a trial -- this trial investigates the proper cracking severity of casein hydrolysate, the ratio of a fraction with a molecular weight of 1000dalton or less, the ratio of a fraction with a molecular weight of 3500dalton or more, the rate of amino acid isolation, and permeability by making an amino acid score, flavor (taste, smell), and preservation stability (whenever **precipitate generation and coloring** ) into an index -- it went to accumulate.

**0078** 1) Except for having changed the cracking severity of casein hydrolysate with 16%, 17%, 20%, 25%, 30%, and 33%, six sorts of samples (sample numbers 6-11) were prepared by the same approach as an example 1 as the halt stage of the

preparation enzyme reaction of a sample was changed and it was shown in Table 2.

**0079** 2) Each of the cracking severity of test-method each sample, the ratio of a fraction with a molecular weight of 1000dalton or less, the ratio of a fraction with a molecular weight of 3500dalton or more, the rate of amino acid isolation, an amino acid score, flavors (taste, smell), permeability, and preservation stability (whenever **precipitate generation and coloring** ) was measured with the aforementioned test method, and was examined.

**0080** 3) a trial result -- the result of this trial is as being shown in Table 2. It became clear that an amino acid score 100, tasteless no odor, and casein hydrolysate excellent in preservation stability were less than 1%, less than 10% of rates of amino acid isolation, and 99% or more of permeability about the ratio of a fraction with 75% **or more** and a molecular weight of 3500dalton or more in 17 - 30% of cracking severity and the ratio of the fraction not more than molecular weight 1000 dalton the passage clear from Table 2.

**0081** In addition, although the class of casein, the class of proteolytic enzyme, and the class of adsorbent resin were changed suitably and examined, the almost same result was obtained.

**0082**

**Table 2**

**0083** the example 3 of a trial -- this trial investigates the conditions of the manufacture approach of casein hydrolysate by making an amino acid score, flavor (taste, smell), and preservation stability (whenever **precipitate generation and coloring** ) into an index -- it carried out for accumulating.

**0084** 1) Except for the existence of processing of adsorbent resin to casein, a proteolytic enzyme, or decomposition deactivation filtrate differing, eight sorts of samples (sample numbers 12-19) of the same cracking severity as an example 1, the ratio of a fraction with a molecular weight of 1000dalton or less, the ratio of a fraction with a molecular weight of 3500dalton or more, the rate of amino acid

isolation, and permeability were prepared by the same approach as an example 1 as shown in the preparation table 3 of a sample.

**0085** 2) Each of amino acid scores of test-method each sample, flavors (taste, smell), and preservation stability (whenever **precipitate generation and coloring** ) was measured with the aforementioned test method, and was examined.

**0086** 3) a trial result -- the result of this trial is as being shown in Table 3. In order to hold an amino acid score 100 and to process decomposition deactivation filtrate and adsorbent resin by short contact time even if it carries out processing by the adsorbent resin to decomposition deactivation filtrate in not carrying out a passage clear from Table 3 before hydrolyzing processing by adsorbent resin to the both sides of casein or casein, and a proteolytic enzyme, the tasteless odorless decomposition product was not acquired.

**0087** Moreover, when processing by the adsorbent resin to filtrate was not carried out, a tasteless odorless decomposition product is not not only acquired by the odor and taste which are produced with hydrolysis or heating, but **even if it carries out before hydrolyzing processing by adsorbent resin to the both sides of casein or casein, and a proteolytic enzyme**, preservation stability got worse. Therefore, in order to manufacture an amino acid score 100, tasteless no odor, and casein hydrolysate excellent in preservation stability, it became clear that it is necessary to carry out and before hydrolyzing processing by adsorbent resin to the both sides of casein or casein, and a proteolytic enzyme, and it was necessary to carry out processing by the adsorbent resin to filtrate.

**0088** In addition, although the class of casein, the class of proteolytic enzyme, and the class of adsorbent resin were changed suitably and examined, the almost same result was obtained.

**0089**

**Table 3**

**0090** Next, although an example is shown and this invention is further explained to a detail, this invention is not limited to the following examples.

**0091**

**Example** 9kg of water was added to example 1 marketing casein (made in New Zealand Dailly Bode) 1kg, it was made to distribute enough, the sodium-hydroxide water solution was added 10%, pH was adjusted to 7.0, casein was dissolved completely, and the casein water solution of about 10% of concentration was prepared. This casein water solution is heat-sterilized for 10 minutes at 85 degrees C, solution temperature is adjusted to 50 degrees C, and it is adsorbent resin (Hokuetsu carbon company make.). The casein solution which carried out adsorption treatment of this solution on condition that SV(space velocity) =2h-1, and carried out adsorbent resin treatment was obtained to KS-35.

**0092** Subsequently, the temperature of the obtained adsorbent resin treatment casein solution (pH7.0) is adjusted to 50 degrees C. Add said sodium hydroxide and pH is adjusted to 9.5. A BIOPURAZE sp-20 (Nagase Seikagaku make) 1,008,000 activity unit (per 1g of protein 1200 activity units) and new TORAZE (Novo Nordisk make) 1,344,000 unit (per 1g of protein 1,600 activity units) are added. When it held and hydrolyzed at 50 degrees C, it acted as the monitor of the enzyme reaction according to cracking severity and cracking severity reached to 23.1%, it heated for 10 minutes at 85 degrees C, deactivation of the enzyme was carried out, the enzyme reaction was suspended, and it cooled at 10 degrees C.

**0093** This decomposition liquid is filtered by the standard super cell (cerite company make) as a filter aid, the temperature of the filtrate subsequently obtained is adjusted to 10 degrees C, and it is adsorbent resin (Hokuetsu carbon company make.). To KS-35, the solution which carries out adsorption treatment of this filtrate

on condition that  $SV=10h^{-1}$ , and contains the obtained casein hydrolysate was condensed with the conventional method, and carried out spray drying, and about 0.86kg of powder-like casein hydrolysate was obtained.

**0094** The result of having examined the obtained casein hydrolysate with said test method is as being shown in drawing 1 (it is as **drawing 1** aforementioned.). 23.1% of cracking severity and the fraction not more than molecular weight 1000 dalton was **the fraction 3500dalton or more of these results to casein hydrolysate** 5.1% of rates of amino acid isolation, an amino acid score 100, and 99.3% of permeability 0.2% 83.0%.

**0095** Moreover, precipitate did not generate in preservation stability, but as for this casein hydrolysate examined with said said test method, whenever **coloring** was as low as 0.222, and it was tasteless no odor mostly.

**0096** Example 2 marketing casein (Merck Co. make.) 8.8kg of water was added to HAMASHUTA Inca zein 1.2kg, it was made to distribute enough, the sodium-hydroxide water solution was added 10%, pH was adjusted to 7.0, casein was dissolved completely, and the casein water solution of about 12% of concentration was prepared. This casein water solution is heat-sterilized for 10 minutes at 85 degrees C, solution temperature is adjusted to 50 degrees C, and it is adsorbent resin (ORGANO CORP. make.). The casein solution which carried out adsorption treatment of this solution on condition that  $SV=2.5h^{-1}$ , and carried out adsorbent resin treatment was obtained to XAD-7.

**0097** Subsequently, the solution temperature of the obtained adsorbent resin treatment casein solution (pH7.0) is adjusted to 50 degrees C. Said sodium hydroxide is added and pH is adjusted to 8.5. A bromelain (Amano Pharmaceuticals company make) 1,224,000 activity unit (per 1g of protein 1200 activity units), An alcalase (Novo Nordisk make) 5,100,000 activity unit (per 1g of protein 5000 activity units), When add a trypsin (ant company make) 2,040,000 activity unit (per 1g of protein 2,000 activity units), it held and hydrolyzes at 50 degrees C, it acts as the monitor of the enzyme reaction according to cracking severity and cracking severity reaches to 25.7% It heated for 3 seconds at 120 degrees C, deactivation of the enzyme was carried out, the enzyme reaction was suspended, and it cooled at 10 degrees C.

**0098** It is this decomposition liquid Mike Rosa EMP-313 (Asahi Chemical Co., Ltd. make.) Using 0.25 micrometers of apertures, insoluble matter is filtered by the membrane-separation method (microfiltration), the solution temperature of the filtrate subsequently obtained is adjusted to 10 degrees C, and it is adsorbent resin (ORGANO CORP. make.). To XAD-7, adsorption treatment of this filtrate was carried out on condition that  $SV=8h^{-1}$ , the obtained processing solution was condensed with the conventional method, and carried out spray drying, and about 1.03kg of powder-like casein hydrolysate was obtained.

**0099** As a result of examining the obtained casein hydrolysate with said test method, 25.7% of cracking severity and the fraction not more than molecular weight 1000 dalton was **the fraction 3500dalton or more** 6.1% of rates of amino acid isolation, an amino acid score 100, and 99.4% of permeability 0.1% 84.3%.

**0100** Moreover, precipitate did not generate in preservation stability, but as for this casein hydrolysate examined with said said test method, whenever **coloring** was as low as 0.220, and it was tasteless no odor mostly.

**0101** Example 3 casein sodium (made in New Zealand Dailly Bode.) ARANETO 1.4kg was dissolved in 12.6kg of water, and the casein water solution of about 10% of concentration was prepared. This casein water solution is heat-sterilized for 10 minutes at 85 degrees C, solution temperature is adjusted to 50 degrees C, and it is adsorbent resin (Dow Chemical Co. make.). The casein solution which carried out adsorption treatment of this solution on condition that  $SV(space\ velocity)=1.5h^{-1}$ ,

and carried out adsorbent resin treatment was obtained to Dowex S-112.

**0102** Apart from this, the proteolytic enzyme mixture which consists of a protease N(Amano Pharmaceuticals company make) 2,380,000 activity unit (per 1g of protein 2,000 activity units) and a SUMICHIMU LP(Shin Nippon Kagaku industrial company make) 5,355,000 activity unit (per 1g of protein 4,500 activity units) was distributed in 4-degree C cold water, it dissolved, and about 10% of proteolytic enzyme solution was prepared as concentration of an enzyme protein. About this proteolytic enzyme solution, it is adsorbent resin (Dow Chemical Co. make.). The proteolytic enzyme solution which carried out adsorption treatment of this solution on condition that  $SV=2.0h^{-1}$ , and carried out adsorbent resin treatment was obtained to Dowex S-112.

**0103** Subsequently, the hot liquid of the obtained casein solution which carried out adsorbent resin treatment is adjusted to 50 degrees C. When added said potassium hydroxide, adjusted pH to 9.2, add said proteolytic enzyme solution which carried out adsorbent resin treatment, it held and hydrolyzes at 50 degrees C, it acts as the monitor of the cracking severity with time and cracking severity reaches to 26.1% It heated for 3 seconds at 120 degrees C, deactivation of the enzyme was carried out, the enzyme reaction was suspended, and it cooled at 10 degrees C.

**0104** It is this decomposition liquid SEP-3013 (Asahi Chemical Co., Ltd. make.) Insoluble matter is filtered by the membrane-separation method (ultra fill tray SHON) using a cut off molecular weight 3000, the solution temperature of the obtained filtrate is adjusted to 10 degrees C, and it is adsorbent resin (Dow Chemical Co. make.). To Dowex S-112, the solution which carries out adsorption treatment of this filtrate on condition that  $SV=12h^{-1}$ , and contains the obtained casein hydrolysate was condensed with the conventional method, and carried out spray drying, and about 1.09kg of powder-like casein hydrolysate was obtained.

**0105** As a result of examining the obtained casein hydrolysate with said test method, 26.1% of cracking severity and the fraction not more than molecular weight 1000 dalton was **the fraction 3500dalton or more** 6.3% of rates of amino acid isolation, an amino acid score 100, and 99.7% of permeability 0.1% 85.1%.

**0106** Moreover, in preservation stability, precipitate did not generate this casein hydrolysate examined with said said test method, but whenever **coloring** was as low as 0.185 and was tasteless no odor mostly.

**0107**

**Effect of the Invention** The effectiveness of being done so by this invention about the new casein hydrolysate which has the good property in which this invention is mostly excellent in the preservation stability in low molecular weight, an amino acid score 100, and an acidic solution condition with tasteless no odor, and its manufacture approach is as follows as a full account was given above.

1) Since it is tasteless no odor mostly, the casein hydrolysate of this invention can be used as a protein supply material of food grades, such as common food and protective foods, and medical application.

2) Since it excels in low molecular weight at digestion nature, the casein hydrolysate of this invention can be used as a protein supply material to the elderly people and sick person to whom the unripe infants of digestion ability or digestion ability is falling.

3) Since it excels in the preservation stability in a solution condition, the casein hydrolysate of this invention can be used as protein materials, such as an acid drink.

4) Since it excels in the amino acid score, the casein hydrolysate of this invention can be used as protein materials, such as food for sport players.

5) The casein hydrolysate which has an extensive application can be manufactured by the approach of this invention.



---

**Brief Description of the Drawings**

**Drawing 1** Drawing 1 shows the molecular weight distribution of the casein hydrolysate of this invention.

---

**Drawing 1**

---